

Humboldt Universität zu Berlin

DISSERTATION

Tumor-spezifische T-Zellen und T-Zellepitope bei kutanen Lymphomen

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)
im Fach Biologie eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
von

Diplom-Biologe Tumenjargal Sharav
geboren am 25.09.70 in Ulaanbaatar

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter Walden
2. Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel
3. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

eingereicht: 18.08.2004

Datum der Promotion: 26.01.2005

Abstract

The major goals of this work was the identification of tumour-associated T cell epitopes (TATE) in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) and the characterisation of the tumour-specific cytolytic immune response. Two tumour-specific cytolytic T cell clones were established from the tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) of one CTCL-patient. The potential natural T cell epitopes and mimotopes (epitopes without natural correlates but with more T cell stimulating capacity) for these T cell clones were identified using a combinatorial peptide library. The quantity and quality of the T cell response was different. The functional avidity of the peptides differed more than 3 orders of magnitude. The cytotoxicity and cytokine release did not correlate for each peptide. Some of the mimotopes were injected into CTCL-patients for therapeutic purpose. The frequency of the mimotope-specific T cell increased during the first vaccination cycles and a tumoricidal capacity could be observed. This first clinical application of the mimotopes showed the capacity of the mimotopes for the modulation of weak anti-tumour immune response. The identification of the new TATE allowed further characterisation of the tumour-specific T cells in the periphery and in the tumour of the patient. High frequency of the tumour-specific T cells could be detected in the tumour but they failed to show effector functions in comparison to the tumour-specific T cells in the peripheral blood. The tumour-specific T cells had the effector memory phenotype but expressed none or less amount of the cytolytic effector molecules. The reason for the suboptimal anti-tumour response in CTCL could be the immunosuppressive cytokine TGF-beta.

Schlagwörter: cutaneous T cell lymphoma, T cell, T cell epitope, combinatorial peptide library, mimotope

Abstract

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen (TATE) in kutanen T-Zelllymphomen (CTCL) und die Charakterisierung der Tumour-spezifischen zytotoxischen Immunabwehr. Zwei Tumor-spezifische T-Zellklone wurden aus den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) eines CTCL-Patienten etabliert. Die potentiellen natürlichen T-Zellepitope und Mimotope (synthetische Epitope ohne natürliche Korrelate aber mit meist hohen T-Zellaktivitäten) für diese Klone wurden mit einer kombinatorischen Peptidbibliothek identifiziert. Die Qualität und Quantität der T-Zellaktivitäten waren bei den jeweiligen Peptiden unterschiedlich. Die funktionellen Aviditäten variierten dabei um 3 Größenordnungen. Bei den einzelnen Peptiden korrelierte die Zytolyse und Zytokinsekretion nicht immer. Mit einigen Mimotopen wurden CTCL-Patienten für therapeutische Zwecke vakziniert. Die Frequenzen der Mimotop-spezifischen T-Zellen erhöhten sich während der ersten Vakzinationszyklen und tumorizide Aktivitäten konnten nachgewiesen werden. Diese ersten klinischen Anwendungen der Mimotope zeigen die Möglichkeit solcher Mimotope die sonst unzureichende Immunabwehr zu modulieren. Die Identifizierung neuer TATE ermöglichte die weitere Untersuchung der Tumor-spezifischen T-Zellen in der Peripherie und im Tumor des Patienten. Diese Analysen zeigten, dass diese Zellen im peripheren Blut aktiv aber im Tumor inaktiv waren. Die TILs waren vom effektor-memory Phänotyp expremiert aber nur schwach oder z. T. keine der Moleküle mit Effektorfunktion. Das immunsuppressive Zytokin TGF-beta könnte eine wichtige Rolle bei dieser unzureichenden Immunabwehr bei CTCL spielen.

Schlagwörter: kutane T-Zell-Lymphome, T-Zellen, T-Zellepitope, kombinatorische Peptidbibliotheken, Mimotope

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Danksagung

Alle experimentiellen Arbeiten wurden in der klinischen Forschergruppe „Tumorimmunologie“ an der Dermatologischen Klinik der Charite - Universitätsmedizin Berlin unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Peter Walden durchgeführt. Sein Interesse und Diskussionsbereitschaft einen entscheidenden positiven Einfluss auf diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry, PD Dr. med. Sylke Gellrich, Dr. med. Marcus Muche, Dr. med. Tanja Fischer und Prof. Dr. med. Helmut Winter danke ich für die Bereitstellung von Patientenmaterialien.

Dr. rer. nat. Katrin Sparbier danke ich für die Überlassung von Messdaten der Dissoziation von TCR-MHC-Peptidkomplexen und Dr. rer. nat. Ansgar Lukowsky für die Fragmentlängenanalysen der TCR.

Meinen Kollegen Rodion Demine, Ulrike Fritz, Arthur O'Connor, Stefanie Gross, Nils Rademacher, Anne Bredenbeck, Stefan Theinert, Dr. rer. nat. Florian Losch, Dietmar Zehn, Saulius Jarmalavicius, Michael Forgber, Verena Hollstein, Anna Kliś und Patricia Zambon danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Für meine Eltern

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Abkürzungen | 1 |
| 2 | Einführung..... | 5 |
| 2.1 | <i>Kutane Lymphome.....</i> | 5 |
| 2.2 | <i>T-Zell-vermittelte Immunantworten</i> | 7 |
| 2.2.1 | MHC-restringierte Antigenerkennung | 7 |
| 2.2.2 | Antigenprozessierung und Antigenpresentation | 9 |
| 2.2.3 | T-Zellrezeptor..... | 10 |
| 2.2.4 | Zytotoxische T-Zellen | 11 |
| 2.2.5 | T-Zellentwicklung..... | 11 |
| 2.3 | <i>Tumor-assoziierte Antigene.....</i> | 13 |
| 2.3.1 | Tumor-assoziierte T-Zellepitope..... | 13 |
| 2.3.2 | Methoden zur Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen..... | 14 |
| 2.3.3 | Tumor-assoziierte T-Zellepitope bei kutanen Lymphomen..... | 16 |
| 3 | Zielstellung..... | 19 |
| 4 | Material und Methoden | 21 |
| 4.1 | <i>Materialien.....</i> | 21 |
| 4.1.1 | Klinische Materialien und Zelllinien..... | 21 |
| 4.1.2 | Standardmedien, Puffer und Medienzusätze | 22 |
| 4.1.3 | Kombinatorische Peptidbibliotheken und synthetische Peptide | 22 |
| 4.1.4 | Antikörper | 23 |
| 4.2 | <i>Zellkulturtechniken.....</i> | 25 |
| 4.2.1 | Isolierung von Lymphozyten aus Bluten und Geweben | 25 |
| 4.2.2 | Cryokonservierung von Zellen..... | 25 |
| 4.2.3 | Zellseparation mittels magnetischer Beads | 25 |
| 4.3 | <i>Funktionelle T-Zellaktivitätsversuche</i> | 26 |
| 4.3.1 | Chromfreisetzungsanalysen..... | 26 |
| 4.3.2 | ELISpot-assay | 27 |
| 4.4 | <i>Durchflusszytometrie.....</i> | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4.1 | Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen..... | 28 |
| 4.4.2 | Intrazelluläre Färbungen auf Zytokine..... | 28 |
| 4.4.3 | Färbung von Tumor-spezifischen T-Zellen mit DimerX..... | 28 |
| 4.4.4 | Sortieren von Zellen per Durchflusszytometrie..... | 29 |
| 4.5 | <i>Molekulargenetische Arbeitsmethoden</i> | 29 |
| 4.5.1 | Präparation genomischer DNA..... | 29 |
| 4.5.2 | TCR- γ -PCR..... | 30 |
| 4.5.3 | Heteroduplex-Temperaturgradienten-Gelelektrophorese..... | 30 |
| 4.5.4 | Sequenzierung der klonal dominanten PCR-Banden..... | 31 |
| 4.5.5 | AT-Klonierung..... | 31 |
| 4.5.6 | Isolierung von RNA..... | 32 |
| 4.5.7 | PCR-Primer..... | 32 |
| 4.5.8 | cDNA-Synthese..... | 33 |
| 5 | Experimente und Ergebnisse..... | 35 |
| 5.1 | <i>Identifizierung von Tumor-spezifischen T-Zellepitopen</i> | 35 |
| 5.1.1 | Generierung von Tumor-reaktiven CTL-Klonen..... | 35 |
| 5.1.2 | Charakterisierung der CTCL-Tumorzellen..... | 37 |
| 5.1.3 | Tumorspezifität der klonierten Tumor-infiltrierenden CD8 ⁺ -T-Zellen..... | 38 |
| 5.1.4 | Die Spezifität des Tumor-reaktiven CTL-Klons PN2..... | 40 |
| 5.1.5 | Expressionsanalysen für die potentielle WeW-Tumor-spezifische TAA..... | 45 |
| 5.1.6 | Spezifität des Tumor-reaktiven CTL-Klons L1..... | 46 |
| 5.2 | <i>Funktionelle Avidität der Tumor-spezifischen T-Zellen</i> | 51 |
| 5.3 | <i>Charakterisierung der Tumorzellen und der Tumor-infiltrierenden T-Zellen</i> | 56 |
| 5.4 | <i>Repertoire der Tumor-spezifischen T-Zellen</i> | 64 |
| 5.5 | <i>Induktion von Tumor-reaktiven T-Zellen in vivo durch Mimotopenvakzination</i> | 68 |
| 5.6 | <i>Tumorreaktivität Mimotop-induzierter T-Zellen</i> | 72 |
| 6 | Diskussion | 77 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 93 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 95 |

| | | |
|-----------|--------------------------------|------------|
| 9 | Anhang | 116 |
| 10 | Publikationsliste | 119 |

1 Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | Antigen-präsentierende Zelle |
| AS | Aminosäure |
| BCIP | 5-Brom-6 Chlor-3-indolylphosphat |
| BCR | engl. <i>B cell receptor</i> |
| Bq | Becquerel, Aktivität einer radioaktiven Substanz |
| BSA | engl. <i>bovine serum albumine</i> , <i>Rinderserumalbumin</i> |
| C | konstanter Teil des TCR |
| CBCL | engl. <i>cutaneous B cell lymphoma</i> |
| CD | engl. <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> |
| CDR | engl. <i>complementary-determining region</i> |
| CLIP | engl. <i>class II-associated invariant chain peptide</i> |
| ConA | Concanavalin A |
| CTCL | engl. <i>cutaneous T cell lymphoma</i> |
| CTL | engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> |
| DC | engl. <i>dendritic cells</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxynukleotid-Triphosphat |
| DTH | engl. <i>delayed-type hypersensitivity</i> |
| EBV | Ebstein-Barr Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ELISpot | engl. <i>enzyme-linked immunospot assay</i> |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FA | funktionelle Avidität |
| FACS™ | engl. <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> |

| | |
|--------------------|--|
| FCS | engl. <i>fetal calf serum</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| h | Stunde |
| HD-TGGE | engl. <i>heteroduplex-loaded temperature gradient gel electrophoresis</i> |
| HLA | engl. <i>human lymphocyte antigen</i> |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| ITAM | engl. <i>immunreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| kDa | kilo-Dalton, Einheit für Molmasse |
| MACS TM | engl. <i>magnetic cell sorting</i> |
| MALDI-PSD | engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-post source decay</i> |
| MFI | engl. <i>mean fluorescence intensity</i> |
| mg/dl | Milligrams/Deziliter |
| MHC | engl. <i>major histocompatibility complex</i> |
| min | Minute |
| mRNA | Messenger-RNA |
| NBT | Nitrotetrazolium Blau |
| NK | engl. <i>natural killer</i> |
| PBMC | engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | engl. <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy5 | Cychrom-5-Derivat von PE |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PMA | Phorbol-Myristate-Acetate |
| RNA | engl. <i>ribonucleic acid</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SFU | engl. <i>spot-forming units</i> |
| β2m | β2-Mikroglobulin |
| TAA | engl. <i>tumor-associated antigen</i> |
| TAP | engl. <i>transporter associated with antigen processing</i> |

| | |
|------|---|
| TATE | engl. <i>tumor- associated T cell epitope</i> |
| TBE | engl. <i>Tris-Borat-EDTA</i> |
| TCR | engl. <i>T cell receptor</i> |
| TIL | engl. <i>tumor infiltrating lymphocyte</i> |
| TNFR | engl. <i>tumor necrosis factor receptor</i> |
| TREC | engl. <i>T cell receptor excision circles</i> |
| Treg | engl. <i>regulatory T cells</i> |
| V | variabler Teil des TCR |

2 Einführung

Tumoren stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Ländern dar. Tumorzellen sind veränderte körpereigene Zellen, die ihre normale Wachstumskontrolle verloren haben. Tumor-spezifische T-Zellen erkennen antigene Strukturen auf der Oberfläche der Tumorzellen und können diese zerstören. Die T-Zell vermittelte Immunantwort spielt damit eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung von entarteten körpereigenen Zellen wie auch von Viruserkrankungen.

2.1 Kutane Lymphome

Kutane Lymphome sind eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Tumoren mit Primärmanifestation in der Haut, die sich entweder von T-Zellen (engl. *cutaneous T cell lymphoma*, CTCL) oder B-Zellen (engl. *cutaneous B cell lymphoma*, CBCL) ableiten. Die Häufigkeit der Erkrankung liegt bei 0,5-1/100000 und macht damit etwa 25% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus (Eichmüller, 2002). Nach der Klassifizierung der EORTC (Willemze, et al., 1997) umfassen die CTCL verschiedene Erkrankungen, von denen die sogenannte *Mycosis fungoides* (MF) mit 44% die häufigste Form darstellt. Die grundlegenden Kriterien für die Diagnose dieser Erkrankungen sind Klinik und Histologie. Klinisch können drei verschiedene Arten von Hautläsionen unterschieden werden: Exzematöse, häufig atrophische Läsionen, rot-schuppige Plaques und Tumoren. Diese Formen sind jeweils für frühe, fortgeschrittene und späte Stadien charakteristisch. CTCL ist meistens eine Erkrankung mit geringer Malignität und einer langsamen Progression, die sich über Jahrzehnte entwickeln kann. Das histologische Erscheinungsbild ist durch typische bandförmige Infiltrate, Epidermotropismus der T-Zellen und eventuell morphologische Besonderheiten der Tumorzellen wie zerebriforme Zellkerne gekennzeichnet. Molekulargenetisch wird die Erkrankung durch den Nachweis eines dominant expandierten T-Zellklons diagnostiziert. In der Regel ist eine Diagnose nur durch Kombination dieser Kriterien möglich. *Mycosis fungoides* mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 87% stellt eher eine indolente Form im Gegensatz zum grosszelligen CD30⁺-CTCL und *Sezary Syndrom* mit 5-Jahres-Überlebensraten von 11%-15% dar. Die Behandlung ist insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien problematisch, da keine kurative Therapie zur Verfügung steht. Immunologische Therapien könnten eine vielversprechende Alternative darstellen, für die jedoch Tumor-spezifische Zielstrukturen benötigt werden.

Phänotypische Analysen zeigen, dass die Haut-infiltrierenden Zellen überwiegend reife Th-Zellen vom *memory* Phänotyp sind, d.h. $CD3^+CD4^+CD8^-CD45RO^+$ (Willemze, et al., 1997). Nur ein kleiner Teil (5%) von allen CTCL-Fällen sind vom $CD3^+CD8^+CD4^-$ -Phänotyp (Nasu, et al., 1985). Es gibt keinen phänotypischen Marker, mit dem die normalen T-Zellen von den malignen T-Zellen unterschieden werden können. Es sind allerdings eine Reihe von phänotypischer Markern für die malignen T-Zellen vorgeschlagen worden: reduzierte CD3-Expression (Edelman and Meyerson, 2000), Fehlen von CD7-Molekülen (Laetsch, et al., 2000; Rappl, et al., 2001), abartig verminderte Expression von CD26 (Bernengo, et al., 2001; Jones, et al., 2001), Verlust von Fas-Rezeptoren (Dereure, et al., 2000; Zoi-Toli, et al., 2000), Expression der NK-Rezeptoren (NKR) p140/KIR3DL2 und Expression des inhibitorischen Rezeptors SC5 (Nikolova, et al., 2002). Keines dieser Marker ist Tumor-spezifisch.

In den meisten Fällen dieser Erkrankung kann ein dominant expandierter T-Zellklon anhand des TCR- γ -Ketten-Rearrangements nachgewiesen und als genetischer Marker für die Tumorzelle benutzt werden (Hindkjaer, et al., 1993; Karenko, et al., 1997; Mielke, et al., 1994). In vielen Fällen findet man auch phänotypisch die Dominanz einer bestimmten TCR-V β -Familie. Die Demonstration von mono- und oligoklonalen TCR- γ -Rearrangements in läsionaler Haut mit Hilfe von PCR und hochauflösender Elektrophoresetechniken oder Fragmentlängenanalysen ist ein wichtiger diagnostischer Marker und eine Ergänzung der klinischen und histologischen Diagnostik von CTCL (Kneba et al., 1994; Wood et al., 1992).

Tumorzellen akkumulieren im Laufe ihrer Evolution immer mehr genetische Veränderungen. Die häufigen Mutationen bei Genen, die Mitose und Apoptose der Zellen regulieren, werden als Promotoren der Tumorentstehung angesehen. Änderungen der Zahl der Chromosomen oder von Chromosomenabschnitten, Translokationen, Amplifikation von bestimmten Genen und Änderungen eines oder weniger Nukleotide können die wesentlichen Mutationsarten bei Tumoren sein. Das Genom von Lymphozyten scheint wegen ihrer zeitweise aktivierten DNA-Rekombinationsmaschinerie besonders für chromosomale Translokationen anfällig zu sein. Bei kutanen T-Zell-Lymphomen können chromosomale Aberrationen große Ausmaße erreichen und einen Großteil der Chromosomen erfassen. Am häufigsten treten Veränderungen in den chromosomalen Bereichen 17q, 10p/q, 13q, 7p/q, X, 3p/q und 6p/q (Fischer, et al., 2004; Karenko, et al., 1997; Thangavelu, et al., 1997) auf.

2.2 T-Zell-vermittelte Immunantworten

2.2.1 MHC-restringierte Antigenerkennung

T-Zellen erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TCR) Peptide im Komplex mit den Haupthistokompatibilitätsantigenen (MHC, engl. *major histocompatibility complex*). CD8⁺-T-Zellen (CD, engl. *cluster of differentiation*) erkennen Peptide von 8 bis 10 Aminosäuren im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen (MHC-I) und CD4⁺-T-Zellen Peptide von 11 bis 15 Aminosäuren im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen (MHC-II) (Janeway et al., 2001). CD8⁺-T-Zellen sind in der Regel zytotoxische T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocytes*) und Haupteffektorzellen bei der Abwehr von Virusinfektionen und Tumoren. CD4⁺-T-Zellen dagegen sind meistens T-Helfer-Zellen (Th), die bei der Aktivierung von B-Zellen und CTL eine wichtige Rolle spielen. Es gibt aber auch Ausnahmen hinsichtlich der Funktion der beiden Zelltypen.

HLA-A, -B und -C werden als sogenannte klassische Transplantationsantigene oder auch Klasse-Ia-Moleküle bezeichnet. Diese Moleküle sind hochpolymorph mit derzeit 303 bekannten Allelen für HLA-A, 559 für HLA-B und 150 für HLA-C (<http://www.ihwg.org> 01/2004). Die meisten Unterschiede zwischen den Allomorphen finden sich dabei in Bereichen, die in die Peptidbindung involviert sind und beeinflussen so die Peptidbindungseigenschaften der einzelnen Allele (Janeway et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurden HLA-E, -F und -G aufgrund des begrenzten Polymorphismus, der beschränkten Gewebeverteilung und der geringen Expression als nicht-klassische Klasse-I-Moleküle oder auch als Klasse-Ib bezeichnet (Le Bouteiller and Lenfant, 1996).

Peptide, die an die MHC-Klasse-Ia-Moleküle binden, müssen ein bestimmtes Bindungsmotiv aufweisen, das von der Struktur des MHC-Allomorphs in der Peptidbindungstasche abhängig ist. Durch Röntgenstrukturanalysen wurde gezeigt, dass sich MHC-I- und MHC-II-Moleküle strukturell sehr ähnlich sind (Bjorkman, et al., 1987; Brown, et al., 1993; Fremont, et al., 1992), selbst bei unterschiedlichen Spezies wie Maus und Mensch. Die Peptidbindungsregion wird jeweils von zwei Domänen gebildet und formt sich aus 2 α -Helices und einer darunter liegenden Platte aus 8 β -Faltblattsträngen. Die Bindungsregion für antigene Peptide ist bei MHC-Ia-Moleküle an beiden Seiten geschlossen, bei MHC-II-Molekülen dagegen offen. Bei HLA-A*0201 sind die Position 2 und 9 eines Nonapeptids in engem Kontakt mit dem MHC – Molekül und werden als Ankerpositionen bezeichnet. Frühere Daten aus Poolsequenzierungen

von Peptiden, die an MHC-I gebunden waren, zeigten, dass für diese Ankerpositionen bestimmte Aminosäuren (AS) bevorzugt sind. Im Falle von HLA-A*0201 sind Leucin und Valin die bevorzugten Ankeramino­säuren in diesen Positionen. Es gibt auch subdominante Anker, die nicht so eng wie die Hauptankerpositionen mit dem MHC in Kontakt stehen, z. B. Position 6 für HLA-A*0201. Bei den MHC-II-Molekülen sind die N- und C-Termini der Peptiden nicht in den Taschen der Peptidbindungsregion verankert, wodurch die Peptide länger als bei den MHC-I-Molekülen sein können. Die Röntgenstrukturanalysen von HLA-DR1, an dem ein Hämagglutinin-Peptid (HA306-318) von Influenza gebunden war, zeigten nur 9 AS innerhalb der Peptidbindungsregion (Stern, et al., 1994). Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen erlauben die MHC-II-Moleküle eine relativ degenerierte Peptidbindung (Falk, et al., 1994).

Kristallstrukturanalysen für den Maus TCR-MHC-Peptidkomplex 2C-TCR-dEV8-H-2Kb (Garcia, et al., 1998; Speir, et al., 1998) sowie für die humane TCR-MHC-Peptidkomplexe A6-TCR-Tax-HLA-A2 (Garboczi, et al., 1996) und B7-TC-Tax-HLA-A2 (Ding, et al., 1998) zeigen ein übereinstimmendes Andockprofil unabhängig von der TCR-Spezifität oder Spezies: TCR-V α bindet die MHC α 2-Helix und TCR-V β die MHC- α 1-Helix. Als Konsequenz scheinen die CDR1- und CDR3-Regionen von den jeweiligen TCR-V α - und -V β Ketten an der Peptidbindung, die CDR2-Regionen aber mehr an der Bindung an MHC beteiligt zu sein. Im Gegensatz zu Antikörpern scheinen die TCR ähnliche und fixierte Bindungsgeometrien für ihre Antigenbindung zu nutzen mit dem TCR diagonal zum MHC-Peptidkomplex.

Die Kristallstrukturanalysen der TCR-MHC-Peptid-Komplexe B7-TCR-Tax-HLA-A2 (Ding, et al., 1998) und A6-TCR-Tax-HLA-A2 (Garboczi, et al., 1996), beide spezifisch für dasselbe Tax-Peptid LLFGYPVYV des humanen *T cell lymphotropic virus HTLV-I*, zeigen, dass bis auf eine Position von 17 TCR-Aminosäurepositionen unterschiedliche TCR-Aminosäurepositionen für das Binden am selben HLA-A2/Tax-Peptidkomplex verantwortlich sind. Dies könnte die unterschiedlichen Effekte von modifizierten Tax-Peptiden auf die Aktivierung von Tax-spezifischen CTL-Klonen erklären. Einzelne AS-Austausche im Tax-Peptid hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die Effektorfunktion der beiden CTL-Klone (Ding, et al., 1998). Die Y8A-Variante, Austausch von Tyrosin gegen Alanin in Position 8, des Tax-Peptids wurde nicht vom CTL-Klon A6 erkannt (Nullpeptid). Der B7-CTL-Klon erkannte zwar bei der Zytolyse diese Variante schwächer als das Tax-Peptid (partieller

Agonist) aber produzierte kein IFN γ . Die Y5A-Variante, Austausch von Tyrosin gegen Alanin in Position 5, hatte dagegen ein partiell agonistischen Effekt bei CTL-Klon A6 war ein Nullpeptid für CTL-Klon B7.

2.2.2 Antigenprozessierung und Antigenpresentation

Bei der Antigenprozessierung von Proteinen entstehen Peptide, die als Komplexe mit MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. Für die Präsentation der MHC-Klasse-I-Peptidkomplexe werden Proteine im Zytosol durch Proteasomen (Coux et al., 1996; Rock et al., 1994) und durch den kürzlich beschriebenen TPP-II-Komplex (engl. *Tripeptidyl peptidase II*) (Seifert, et al., 2003) unter Energieverbrauch abgebaut, wobei Peptidfragmente entstehen, die von Aminopeptidasen weiter abgebaut werden können. Wahrscheinlich spielt die Markierung der zu verarbeitenden Proteine mit Ubiquitin eine wichtige Rolle für den Abbau durch Proteasen (Bachmair and Varshavsky, 1989; Townsend, et al., 1988; Varshavsky, 1997). Die entstandenen Peptidfragmente werden durch den TAP-Transporter (engl. *transporter associated with antigen processing*) ins ER transportiert. TAP ist ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2, und gehört zur Familie der ABC-Transporter. Im ER werden die Peptide in die neuentstandenen MHC-I-Moleküle eingebaut. Die MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus 2 Untereinheiten, einer α -Kette mit 45kDa und einer β -Kette, dem β 2-Mikroglobulin (β 2m) mit 12kDa. Die neusynthetisierte α -Kette wird durch Bindung an das membrangebundene Calnexin partiell gefaltet und im ER zurückgehalten (Vassilakos, et al., 1996). Lagert sich β 2m an die α -Kette dissoziiert das $\alpha\beta$ 2m-Molekül von Calnexin und bindet an einen Proteinkomplex aus Calreticulin und Tapasin, einem mit TAP1 assoziierten Protein. Es ist noch nicht geklärt, ob das TAP-Protein direkt an der Bindung eines Peptids durch das MHC-Klasse-I-Molekül beteiligt ist, oder ob einfach die räumliche Nähe von TAP und MHC-I-Molekülen eine effiziente Bindung gewährleistet. Die Bindung eines Peptids an das MHC-Molekül bewirkt die Loslösung vom TAP-Komplex. Das nun vollständig gefaltete und beladene MHC-I-Molekül wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

Die Prozessierung von extrazellulär aufgenommen Proteinen zu Peptiden, die auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden, findet in den Endolysosomen statt (Braciale and Braciale, 1991). Auch zytosolische Peptide können von MHC-II-Molekülen gebunden und präsentiert werden (Oxenius, et al., 1995; Pinet, et al., 1994). Durch den Abbau durch Proteasen

entstehen Peptide von 12-24 AS (Hunt, et al., 1992; Rudensky, et al., 1991). Im endoplasmatischen Retikulum (ER) können vermutlich keine Peptide an den MHC-II-Molekülen gebunden werden, da diese während ihres Aufenthalts im ER mit der invarianten (Ii)-Kette assoziiert sind, wodurch die Peptidbindungsgrube blockiert ist (Long, et al., 1994). Lysosomale Proteasen (Wolf and Ploegh, 1995), insbesondere Cathepsin L (Nakagawa, et al., 1998), degradieren die Ii-Kette. Anschließend wird CLIP (engl. *class II-associated invariant chain peptide*) unter Wirkung des Chaperonmoleküls HLA-DM aus der Bindungsgrube entfernt (Denzin and Cresswell, 1995; Kelly, et al., 1991; Sloan, et al., 1995), wodurch vermutlich der Austausch mit den antigenen Peptiden ermöglicht wird. Eine alternativer Weg, bei dem rezirkulierte MHC-II-Moleküle unabhängig von Proteinsynthese und HLA-DM in frühe Endosomen Peptide binden können, wurde ebenfalls beschrieben (Pinet and Long, 1998).

2.2.3 T-Zellrezeptor

Der T-Zellrezeptor (TCR) besteht entweder aus α - und β -Ketten oder γ - und δ -Ketten, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbundene Glycoproteine mit Immunglobulinstruktur sind. Die meisten peripheren, d.h. reifen, ausserhalb des Thymus existierenden T-Lymphozyten, exprimieren den $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor, welcher für die Erkennung von MHC-Peptid-Komplexen verantwortlich ist (Schwartz, 1985). Mit dem $\alpha\beta$ -Dimer sind weitere Moleküle aus der CD3-Familie nicht-kovalent assoziiert nämlich CD3 γ , δ , ζ , ϵ und η , die an der Signaltransduktion in Zelle beteiligt sind. Diese Moleküle bilden über Disulfidbrücken Heterodimere ($\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\eta$) oder Homodimere ($\zeta\zeta$). Die zytoplasmatischen Teile dieser CD3-Ketten enthalten sogenannte ITAM (engl. *immunreceptor tyrosine-based activation motif*), die mit Tyrosinkinasen in Wechselwirkung treten, phosphoryliert werden und so zur Signaltransduktion beitragen (Flaswinkel et al., 1995).

Der variable N-terminale Bereich des Rezeptors ist für die Antigenerkennung und –spezifität verantwortlich. Die Gene für die variablen Domänen des TCR setzen sich auf genomischer Ebene aus bis zu drei Gensegmenten zusammen, die in den Frühphasen der T-Zellontogenese rearrangiert werden. Bei β - und δ -Ketten werden die variablen Domäne aus V- (*Variability*), D- (*Diversity*) und J- (*Joining*) Regionen zusammengesetzt. Die α - und γ - Ketten bestehen nur aus V- und J-Region. Jedes dieser Gensegmente ist durch mehrere verschiedene Exone kodiert von denen jeweils eins beim Rearrangement in das komplette Gen für den TCR

eingefügt wird. Bei der Rekombination dieser Gene werden scheinbar wahllos Nukleotide eingefügt oder einzelne Nukleotide herausgeschnitten. Sofern das Leseraster nicht verschoben wird, entsteht ein funktionales TCR-Gen. Diese neu entstandene Nukleotidsequenz wird als N-Region bezeichnet und ist spezifisch für jede einzelne T-Zelle und deren Abkömmlinge. Durch das Rearrangement der einzelnen Gensegmente zusammen mit der N-Region-Diversifizierung ergibt sich insgesamt eine Diversität von bis zu 10^{15} potentiellen TCR-Varianten (Janeway et al., 2001).

2.2.4 Zytotoxische T-Zellen

Nach Erkennung von geeigneten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen auf der Oberfläche von Zielzellen werden die zytotoxische T-Zellen (CTL) aktiviert. Infolge der Aktivierung wird die Zielzelle lysiert und/oder spezifisch $\text{IFN}\gamma$ produziert. Es gibt bis jetzt 2 bekannte Mechanismen für die zellvermittelten Zytotoxizität der CD8^+ -T-Zellen. Der erste besteht in der Sekretion von Perforin und Granzymen. Beide sind in Granula in den CTL gespeichert und werden nach Antigenerkennung freigesetzt. Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle zu einer großen Pore. Durch diese Poren werden Granzyme ins Zellinnere geschleust. Dort aktivieren sie Caspasen, spezifische Proteasen, die die Apoptosemaschinerie der Zellen in Gang setzen (Masson and Tschopp, 1987; Nabholz and Tschopp, 1989; Pasternack, et al., 1986; Podack ER, 1984; Tschopp and Jongeneel, 1988). Dieser Mechanismus der zellvermittelten Zytotoxizität ist Ca^{2+} abhängig und kann durch EGTA unterdrückt werden (MacLennan, et al., 1980). Der zweite Zytotoxizitätsmechanismus ist antigenunabhängig und zugleich nicht abhängig von Ca^{2+} im extrazellulären Milieu. Der Kontakt zwischen Fas (CD95) auf der Oberfläche von Zielzellen und FasL auf der Effektorzelle führt zur Aktivierung von Caspasen in der Zielzelle und Apoptose (Longthorne and Williams, 1997; Rouvier, et al., 1993). Die Apoptose der Zielzelle äußert sich durch charakteristische morphologische Änderungen wie Schrumpfung der Zelle, Kondensation des Chromatins, DNA-Degradation und schliesslich Zerfall der Zelle.

2.2.5 T-Zellentwicklung

Die reifen T-Zellen entwickeln sich aus T-Vorläuferzellen (Thymozyten) im Thymus, wo auch das Rearrangement der TCR-Genen stattfindet. Bei Mäusen wurde jedoch mehrfach gezeigt, dass auch außerhalb des Thymuses, vermutlich im Darmepithel, eine Entwicklung von T-Vorläuferzellen möglich ist (Guy-Grand, et al., 1991; Rocha, et al., 1994). Beim

Menschen gibt es entsprechende Untersuchungen von Howie und Kollegen (Howie, et al., 1998). Während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen die T-Vorläuferzellen verschiedene Differenzierungsstufen, in denen sie mehrfach phänotypisch und funktionell selektioniert (positive und negative Selektion) werden. T-Vorläuferzellen (Thymozyten) mit passenden TCR für das MHC-Molekül des Thymusepithels bekommen durch ihr erfolgreiches Andocken ein Überlebenssignal und werden positiv selektioniert. Thymozyten, deren TCR nicht paßt, bekommen dieses Überlebenssignal nicht und gehen in die Apoptose (*non-selection; death by neglect*). Die positive Selektion bewirkt eine Selbst-MHC-Restriktion, d.h. alle Zellen, die diesen Prozeß überstehen, erkennen Peptide zusammen mit den eigenen MHC-Molekülen. Unter den Thymozyten, die TCR exprimieren und die mehr oder weniger gut mit eigenen MHC-Molekülen harmonisieren, gibt es auch solche, die perfekt auf eine Kombination von eigenem MHC mit darauf präsentiertem Selbst-Peptid passen. Diese sind eigentlich unerwünscht, weil sie autoreaktiv und damit gefährlich sind. Solche autoreaktiven T-Zellen werden negativ selektioniert d.h. eine sehr starke Bindung führt zu einem qualitativ anderen Signal und zur Apoptose (von Boehmer et al., 1989; Nossal et al., 1994). Bisher wurde angenommen, dass die Selektionsprozesse im Thymus gewährleisten, dass nur solche T-Zellen in die Peripherie wandern, die in der Lage sind, körpereigene von körperfremden Antigenen zu unterscheiden. Bei den bislang identifizierten Tumor-assoziierten Antigenen handelt es sich aber z.T. um körpereigene Antigene. Die Detektion von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie von Krebspatienten und Gesunden zeigt, dass T-Zellen der negativen Selektion entgehen können.

Im Thymus beginnen die T-Vorläuferzellen CD2 und CD1a zu exprimieren, gefolgt von CD4, CD8 α und als letztes CD8 β (Galy, et al., 1993). Während dieser Entwicklung werden die TCR-Gensegmente für δ -, γ - und β -Ketten des TCR rearrangiert. Die TCR δ -Gensegmente werden bereits in den früheren CD34⁺CD1a⁺-Thymozyten rekombiniert, danach folgen die TCR γ -Gensegmente. Das Rearrangement der TCR β -Kette dagegen kann erst bei CD4⁺CD8 α ⁺ β ⁻-Zellen nachgewiesen werden (Blom, et al., 1999). Die TCR α -Gensegmente werden vermutlich erst danach rearrangiert. Da die TCR δ -Gensegmente innerhalb der Region der TCR α -Gene lokalisiert sind, werden sie beim Rearrangement von TCR α deletiert. Obwohl der größte Teil der reifen T-Zelllinien beim Menschen den TCR $\alpha\beta$ exprimiert und nur ein kleiner Teil den TCR $\gamma\delta$, kann die rearrangierte γ -Kette in allen T-Zellen nachgewiesen werden (Jensenius and Williams, 1982).

2.3 Tumor-assoziierte Antigene

2.3.1 Tumor-assoziierte T-Zellepitope

Die T-Zell-definierten Tumorantigene werden durch Tumor-spezifische CTL erkannt. Im allgemeinen können zwei Arten von Tumorantigenen unterschieden werden: Tumor-spezifische (TSA) und Tumor-assoziierte Antigene (TAA). Tumor-spezifische Antigene (TSA) werden nur von den Tumorzellen exprimiert. Im Gegensatz dazu können die Tumor-assoziierten Antigene (TAA) auch von nicht-transformierten Zellen exprimiert werden. Desweiteren können die Antigene aufgrund ihrer Expressionsmuster folgendermaßen unterschieden werden:

Gewebe-spezifische Differenzierungsantigene, die von Proteinen abgeleitet sind, welche dem Zelltyp und dem Differenzierungsgrad der Zellen entsprechend exprimiert werden. Zahlreiche Melanom-assoziierten Antigene wie MART-1/Melan A, gp100, Tyrosinase und *Tyrosin-related protein* (TRP) gehören zu dieser Gruppe. Diese Antigene sind nicht Tumor-spezifisch, da sie auch von normalen Melanozyten exprimiert werden. Dementsprechend wird befürchtet, dass der Einsatz solcher Antigene für die Immuntherapie Autoimmunreaktionen gegen das entsprechende gesunde Gewebe auslösen könnte.

„*Cancer-testis*“-Antigene werden von Tumorzellen nicht aber von normalen Zellen mit Ausnahme von Testis und Plazenta exprimiert. Zahlreiche Tumor-assoziierte T-Zellepitope (TATE) aus den Proteinen der MAGE-, BAGE-, GAGE-, LAGE- und NY-ESO-1 Familien wurden identifiziert. Da die Trophoblasten im Plazenta und Keimbahnzellen in Testisgewebe keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, werden die Antigene nicht auf der Zelloberfläche präsentiert und sind daher für die T-Zellen nicht zugänglich. Die „*cancer-testis*“-Antigene sind deswegen relativ Tumor-spezifisch.

Durch Punktmutationen kann es zu einem AS-Austausch oder einer Verschiebung des Leserasters innerhalb eines Gens kommen (Echchakir, et al., 2001; Novellino, et al., 2003). Auch Peptide aus kryptischen Translationsprodukten (Malarkannan, et al., 1995) und sogar Intron-kodierende Sequenzen können Antigene für CTL sein (Coulie, et al., 1995; Guilloux, et al., 1996; Robbins, et al., 1997). Antigene, die aus Genmutationen entstehen, sind meistens Patienten- und Tumor-spezifisch und können nicht für Immuntherapien bei anderen Patienten angewendet werden. Manche der Mutationen können auch an der Transformation der malignen Zelle beteiligt sein. T-Zellepitope, die aus Mutationen hervorgehen, sind die einzigen wirklichen Tumor-spezifischen Epitope.

In Tumorzellen überexprimierte Proteine können auch von normalen, nicht transformierten Zellen exprimiert werden. Durch geringer exprimierte Antigenmengen könnten die normalen Zellen der Zytolyse durch niedrig affine auto-reaktive T-Zellen entgehen.

In Tumoren können Gene exprimiert werden, die normalerweise nur in frühen embryonalen Entwicklungsstadien aktiv sind. z.B. α -Fetoprotein wird in fötalen oder malignen aber nicht in normalen Hepatozyten exprimiert (Abelev, et al., 1963; Sell, et al., 1976). Ein entsprechendes T-Zellepitop wurde in diesem Protein von Butterfield und Kollegen identifiziert (Butterfield, et al., 1999).

Auch Viren wie HTLV (engl. *human T lymphocyte virus*), EBV (*Ebstein-Barr Virus*) und Papillomavirus wurden im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben. Es sind eine Reihe von T-Zellepitopen aus solchen onkogenen Viren beschrieben worden (Jochmus, et al., 1997; Rammensee, et al., 1995).

2.3.2 Methoden zur Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen

Es gibt eine Reihe von Strategien für die Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen bzw. T-Zellepitopen, die je nach Tumor und Situation ausgewählt werden können.

Die direkte Isolierung und Sequenzierung von MHC-gebundenen Peptiden mit Hilfe von hoch auflösenden Chromatographie-Verfahren und Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit eine Reihe von Peptiden simultan zu analysieren (Castelli, et al., 1995; Flad, et al., 1998). Mit einem nicht-ionischen Detergenz in isotonischem Puffer werden die Membran-gebundenen Proteine der Tumorzellen solubilisiert. Danach werden die MHC-Peptid-Komplexe affinitätschromatographisch isoliert und die Peptide sauer extrahiert. Mit Hilfe von *reversed-Phase* (RP)-Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) werden die eluierten Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Da die HPLC-Fractionen eine Mischung aus vielen verschiedenen Peptiden darstellen, ist ein weiterer HPLC-Trennschritt häufig erforderlich. Die Erkennung von immunologisch interessanten Peptiden kann durch etablierte Tumor-spezifische T-Zelllinien oder durch frisch isolierte TILs bzw. PBMC des Tumorpatienten erfolgen. Peptide in Mengen von 100 fMol bis 1,5 pMol reichen zur hoch sensitiven Analyse mittels Massenspektrometrie (MALDI-PSD, engl. *matrix-assisted laser desorption ionization-post source decay*). Um aber diese Mengen an Peptid für die Endanalyse zu bekommen, braucht man in der Regel 5 bis 10 g reines Ausgangstumormaterial, was selten der Fall ist. Eine Alternative wäre es, etablierte Tumorzelllinien in großen Mengen zu züchten. Dies spiegelt aber leider nicht unbedingt die

Physiologie der Tumorzelle *in vivo* wieder. Dementsprechend kann in diesem Falle der Nachweis, dass das gefundene Peptid wirklich in Verbindung mit *in vivo* zirkulierenden Tumor-assoziierten T-Zellen steht, schwieriger werden. Die Induktion von Tumor-assoziierten T-Zellen mit den isolierten Peptiden oder HPLC-Fraktionen *in vitro* ist dann notwendig für die Verifizierung der TATE.

Mit molekulargenetischen Verfahren wurden die ersten (van der Bruggen, et al., 1991) und auch die meisten der bekannten TAA bei Melanomen identifiziert. Mit Hilfe von cDNA-Expressionsbibliotheken und Co-Transfektion mit MHC-Molekülen in geeignete Zellen können Gene, die ein Tumorantigen kodieren, mittels Tumor-spezifische CTL-Linien identifiziert werden. Dabei werden cDNA-Klone zusammen mit den Genen für die MHC-Moleküle in COS-7 Zellen transfiziert. COS-7 ist eine Affenzelllinie, d.h. sie exprimiert keine humanen MHC-Moleküle. Dies ermöglicht eine genaue Untersuchung der HLA-Restriktion der humanen CTL-Klone. Durch weitere Subklonierung und Sequenzierung der cDNA-Klone werden die Tumorantigen-kodierenden Gene identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man mit wenig Tumormaterial auskommen kann, allerdings sind mehrere zeitaufwendige Selektionsschritte erforderlich.

Die serologische Analyse von rekombinanten cDNA-Expressionsbibliotheken (SEREX, engl. *serological analysis of recombinant cDNA expression libraries*) wurde von Pfreundschuh und Kollegen in die Tumorummunologie eingeführt (Pfreundschuh, et al., 1978). Für die Identifizierung von Tumorantigen-kodierenden Genen werden autologe Antikörper benutzt. Aus dem Tumormaterial werden cDNA-Expressionbibliotheken hergestellt und über den Bakteriophage Lambda in *Escherichia coli* zur Expression gebracht. Die Lysate von transfizierten *E.coli* werden auf einer Nitrozellulosemembran gebunden und anschliessend mit Patientenseren inkubiert. Die Entwicklung des Blots erfolgt mit einem sekundären anti-human Fc γ -Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Klone, die ein Tumorantigen-kodierendes Gen enthalten, werden durch Zugabe eines geeigneten Substrats sichtbar gemacht. Mehrere bereits bekannte Tumor-assoziierte Antigene wie MAGE-1 und Tyrosinase konnten bei der Anwendung dieser Methode wiederentdeckt werden (Sahin, et al., 1995). SEREX führt primär zur Identifizierung von Antigenen für humorale Immunantwort. Bisher wurde in wenigen Fällen in demselben Antigen auch T-Zellepitope für MHC-Klasse-I-restringierte T-Zellen gefunden.

Die Bioinformatik eröffnet neue Wege zur Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen. Die Vollendung des Humangenom-Projektes und Algorithmen zur Epitopvorhersage über deren HLA-Bindung erlauben die Identifizierung von neuen T-Zellepitopen. Die Expressionanalysen mit Hilfe von Array-Techniken könnte zu Kandidatengenomen führen, die in Tumor spezifisch exprimiert werden. Die Kombination der Vorhersage von MHC-Liganden mit den Daten zur proteosomalen Spaltung könnte zu Epitopen, die auch natürlicherweise präsentiert werden, führen. Für die Vorhersage der proteosomalen Spaltung von Proteinen gibt es derzeit drei Datenbanken mit Vorhersagealgorithmen: FragPredict: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/>, PAProc: <http://www.paproc.de> und NetChop: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>. Kuon und Kollegen konnten mit Hilfe von FragPredict und des SYFPEITH-Programms potentielle T-Zellepitope aus *Chlamydia trachomatis* Genom identifizieren (Kuon, et al., 2001).

Randomisierte kombinatorische Peptidbibliotheken wurden für die Bestimmung von MHC-Bindungsmotiven bei MHC-Klasse-II-Molekülen (Fleckenstein, et al., 1996) und für die Identifizierung von Epitopen alloreaktiver (Gundlach, et al., 1996; Udaka, et al., 1995; Udaka, et al., 1996), Antigen-spezifischer (Hemmer, et al., 1997; Hemmer, et al., 2000; La Rosa, et al., 2001) und Tumor-spezifischer (Blake, et al., 1996; Linnemann, et al., 2001; Pinilla, et al., 2001; Rubio-Godoy, et al., 2002b) T-Zellen erfolgreich angewendet. Die Anwendung der Peptidbibliotheken für die Identifizierung von neuen TATE eines Tumor-spezifischen CTL-Klons wurde erstmals von Linnemann und Kollegen berichtet (Linnemann, et al., 1998). Neben der Identifizierung von TCR-Liganden für CTL-Klone mit bekannter Spezifität (Pinilla, et al., 2001; Rubio-Godoy, et al., 2002b) wurde auch ein natürlicher TCR-Ligand für einen Tumor-spezifischen CTL-Klon mit bis dahin unbekannter Spezifität identifiziert (Rubio-Godoy, et al., 2002a).

2.3.3 Tumor-assoziierte T-Zellepitope bei kutanen Lymphomen

Da bisher nur zwei CTCL-Zelllinien (Kaltoft, et al., 1992; Kaltoft, et al., 1987) etabliert werden konnte und die primären Tumormaterialien rar und häufig nicht ausreichend sind, können die meisten der oben genannten Methoden nicht angewandt werden. Dementsprechend stehen die Bemühungen zur Aufklärung der Antigenität kutaner Lymphome noch am Anfang. Eichmüller und Kollegen zeigten, dass viele der bekannten *cancer-testis*-Antigene auch in CTCL in unterschiedlichem Maße exprimiert werden (Eichmüller, et al., 2003). Allerdings wurde bis jetzt keine T-Zellepitope aus den *cancer-testis*

Proteinfamilien für CTCL nachgewiesen. Bagot und andere Kollegen haben zwar MHC-Klasse-I-restringierte, Tumor-reaktive T-Zelllinien aus PBMC oder TIL von CTCL-Patienten etablieren können, aber das Antigen dafür nicht gefunden (Bagot, et al., 1998; Berger, et al., 1996; Seo, et al., 1998). Der klontypische TCR der malignen T-Zelle könnte eine potentielle Tumorentigenquelle bei CTCL sein. Peptide mit den jeweiligen passenden MHC-Motiven aus variablen (V), konstanten (C) und CDR3-Regionen von TCR α - und TCR β -Ketten konnten durch *in vitro* generierte CTLs erkannt werden (Berger, et al., 2001; Winter, et al., 2003). Der Nachteil hier ist, dass die klontypischen TCR-Sequenzen nur für einen Patient Bedeutung haben. Mit Hilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken wurden sogenannte *Mimotope* für CTCL identifiziert (Linnemann, et al., 2001). Diese HLA-B8-restringierte Mimotope wurden aus der Spezifität des T-Zellklons MyLa-CTL abgeleitet. MyLa-CTL ist spezifisch für die CTCL-Tumorzelllinie MyLa. Obwohl das natürliche Antigen für diese Mimotope nicht bekannt ist, konnten in 80% (13/16) der HLA-identen CTCL-Patienten Mimotop-spezifische T-Zellen detektiert werden. In 2 von 9 gesunden Probanden wurden niedrige Frequenzen der Mimotop-spezifischen T-Zellen nachgewiesen. Diese Mimotope repräsentieren damit ein verbreitetes CTCL-assoziiertes TATE. Allerdings fehlte bislang der experimentielle Nachweis für die Tumorspezifität der Mimotop-spezifischen T-Zellen in CTCL-Patienten.

Tabelle 1: Liste aller bislang bekannten CTCL-assoziierten TATE

| Ursprungs- proteine | Sequenz | Methode für die Entdeckung | Literatur |
|------------------------|--|---|---------------------------|
| TCR | VYFCASSFV | TCR-Sequenzierung und Epitopvorhersage | Berger et al., 2001 |
| unbekannt | PVKTYDIKL PVKTKDAKL | Peptidbibliotheken | Linnemann et al., 2001 |
| TCR | ALLGILSAQV GQLINLFYI ILWLQPDWV VIFGPGTSL KLVEKSFET LLLKVAGFNL | TCR-Sequenzierung und Epitopvorhersage | Winter et al., 2003 |

3 Zielstellung

Die Ziele dieser Arbeit waren die Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen und T-Zellepitopen und die Charakterisierung von Tumor-spezifischen T-Zellen bei CTCL.

Aufgrund der seltenen und geringen Tumormaterialien sollten Tumor-assoziierte T-Zellepitope mit Hilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken definiert und dann mit diesen Epitopen die Spezifität sowie die phänotypischen und funktionellen Charakteristika der Tumor-reaktiven T-Zellen untersucht werden.

Zur Erreichung der Ziele wurden

- T-Zellen aus einer Tumorerläsion eines CTCL-Patienten kloniert und in Kultur etabliert,
- die Tumor-Spezifität der T-Zellklone nachgewiesen,
- die Spezifitätsprofile der Tumor-spezifischen T-Zellklone mit kombinatorischen Peptidbibliotheken bestimmt,
- T-Zellepitope durch Kombination aktiver Aminosäuren generiert oder durch Suche nach Sequenzen in Genomdatenbanken, die zu den Spezifitätsprofilen passen, bestimmt,
- Tumor-infiltrierende Lymphozyten auf Tumor-spezifische T-Zellen untersucht,
- die Phänotypen der Tumor-spezifischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Klinische Materialien und Zelllinien

Alle Hautbiopsien und Blutproben von den CTCL-Patienten sowie die Blutproben der gesunden Spender wurden mit deren Einverständnis und der Zustimmung der Ethikkommission der Charite für die hier beschriebenen Arbeiten verwendet und von Dr. Sylke Gellrich, Dr. Marcus Muche oder Dr. Tanja Fischer bereitgestellt. Folgende Zelllinien und Klone wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 2: **verwendete Zelllinien und –klone**

| Abkürzung | MHC-Klasse-I | Beschreibung | Literatur |
|-----------|--|--|--------------------------|
| T2 | A*0201, B5 | TAP- defiziente Zelllinie | Salter et al., 1985 |
| K562 | keine | myeloische Zelllinie, NK-sensitive Zielzellen | Lozzio et al., 1975 |
| MyLa | A1, B8 | Tumorzelllinie aus CTCL-Patienten | Kaltoft et al., 1992 |
| PN2 | A*0201, A26(10), B44(12)(Bw4), B51(5)(Bw4) | Tumor-spezifischer CD8 ⁺ -T-Zellklon aus CTCL-Patienten WeW | diese Arbeit |
| L1 | | Tumor-spezifischer CD8 ⁺ -T-Zellklon aus CTCL-Patienten WeW | diese Arbeit |
| Mimo-IrM | A*0201, A11, B8(w6), B51(5)(w4) | CTL-Linie aus einem CTCL-Patienten, spezifisch für die Peptide PVKTKDIKL und PVKTYDIKL | Tumenjargal et al., 2003 |
| CMV-IrM | | CTL-Linie aus einem CTCL-Patienten, spezifisch für Peptid NLVPMVATV | Tumenjargal et al., 2003 |
| EBV-IrM | | EBV transformierte B-Zelllinie aus einem CTCL-Patienten | Tumenjargal et al., 2003 |
| ELA-Trit | A*0201 u.a. | CD8 ⁺ -T-Zelllinie aus einem Melanompatienten, spezifisch für Peptid ELAGIGILTV | Trefzer et al., 2004 |

4.1.2 Standardmedien, Puffer und Medienzusätze

Medien:

AIM-V-Medium: mit L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycinsulfat, 10 µg/ml Gentamycinsulfat, 0,25% humanes Serumalbumin (Invitrogen, Karlsruhe)

DMEM: mit 4,5 mg/dl Glukose, 25 mM Hepes, Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe)

Medium für ELISpot: X-Vivo 15®-Medium (BioWhittaker, Apen)

Peptidbeladungsmedium: DMEM Medium mit 0,1%BSA

Einfriermedium: 10% DMSO (Serva, Heidelberg), 90% FCS (Sigma, Taufkirchen)

Puffer:

PBS ohne Magnesium und Kalzium, PBS w/o (Invitrogen, Karlsruhe)

PBS (Invitrogen, Karlsruhe)

MACS-Puffer für magnetische Zellseparation: PBS w/o mit 2mM EDTA und 0,1%BSA

FASC-Puffer für Durchflusszytometrie: PBS w/o mit 0,01% Natriumazid und 0,1%BSA

Zur Supplementierung verwendeten Reagenzien und Lösungen:

fötales Kälberserum (FCS), (Sigma, Taufkirchen)

2-Mercaptoethanol (Invitrogen, Karlsruhe)

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe)

Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V (Fluka, Taufkirchen)

EDTA (Merck, Bad Soden)

Natriumazid (Sigma, Taufkirchen)

DMSO (PIERCE, Bonn)

4.1.3 Kombinatorische Peptidbibliotheken und synthetische Peptide

Die kombinatorischen Peptidbibliotheken (X₉ und OX₈) und alle synthetischen Peptide (siehe **Abb. 16** und **Tabelle 9**) wurden von *EMC Microcollections* (Tübingen) bezogen. Die Synthese waren an fester Phase mit prä-aktivierten Aminosäuren mittels der *Fmoc* Technik durchgeführt worden (Jung, 1996). Im Fall der Peptidbibliotheken wurden die Aminosäuren vorher gemischt (*premix strategy*). Anschließend wurde die Qualität der Peptide per Massenspektrometrie analysiert. Die randomisierten kombinatorischen Peptidbibliotheken setzen sich aus Nonapeptiden zusammen, die an einer Sequenzposition eine definierte Aminosäure (O) besitzen, während alle anderen Positionen randomisiert sind (X). Der

komplette Satz von Nonapeptidbibliotheken für die Bestimmung von TCR-Epitopen besteht aus einer völlig randomisierten X₉-Bibliothek, die 19 AS für 9 Positionen oder theoretisch 19⁹, d.h. etwa 3,23x10¹¹ verschiedene Peptide enthält, und 171 OX₈-Subbibliotheken, wobei jede Subbibliothek 19⁸ oder etwa 1,6 x 10¹⁰ verschiedene Peptide enthält. Cystein wurde ausgeschlossen, um Probleme mit Oxidierungen oder Dimerisierungen zu vermeiden. Alle synthetischen Peptide und die kombinatorischen Peptidbibliotheken wurden unter Stickstoff in DMSO (PIERCE, Bonn) gelöst (20 mg/ml Stammlösung) und bei –80°C gelagert.

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | |
|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------|
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | X | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | O | X | X | X | X | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | O | X | X | X | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | O | X | X | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | O | X | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | O | X | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | X | O | X | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | X | X | O | X | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | X | X | X | O | X | COO [–] |
| ⁺ H ₃ N– | X | X | X | X | X | X | X | X | O | COO [–] |

Abbildung 1: Kombinatorische Peptidbibliotheken in X₉ - und OX₈-Format. O: definierte Sequenzposition, X: randomisierte Sequenzposition mit A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y.

4.1.4 Antikörper

Die Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der **Tabelle 3** mit Angabe ihrer Hersteller bzw. Vertreiber aufgelistet.

Tabelle 3: Liste der Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden

| Spezifität | Antikörper | Spezies | Isotyp | Fluorochrom | Hersteller |
|-----------------|-------------|---------|----------|-------------|-------------|
| CD3 | UCHT1 | Maus | IgG1, k | Alexa 405 | DREZ |
| CD3 | SK7 | Maus | IgG1, k | APC-Cy7 | BD |
| CD4 | TT1 | Maus | IgG1, k | Alexa 430 | DREZ |
| CD8 | RPA-T8 | Maus | IgG1, k | PE-Cy7 | BD |
| CD8 | RPA-T8 | Maus | IgG1, k | APC | BD |
| CD19 | SJ25-C1 | Maus | IgG1, k | Tri-Color | Caltag |
| CD30 | Bar-H2 | Maus | IgG1 | FITC | DAKO |
| CD45RO | UCHL1 | Maus | IgG2a | FITC | DAKO |
| CD45RA | HI100 | Maus | IgG2a, k | PE | BD |
| CD56 | B159 | Maus | IgG1, k | APC | BD |
| CD69 | FN50 | Maus | IgG1, k | APC-Cy7 | BD |
| CD95 | DX2 | Maus | IgG1, k | APC | BD |
| CD95L | NOK-1 | Maus | IgG1, k | PE | eBioscience |
| HLA-ABC | W6/32 | Maus | IgG2a | PE | DAKO |
| HLA-DR | L243 | Maus | IgG2a | APC | BD |
| IFN γ | 25723.11 | Maus | IgG1 | FITC | BD |
| IL-2 | 5344.111 | Maus | IgG1 | PE | BD |
| TCR-V β 2 | MPB2D5 | Maus | IgG1 | FITC | BD |
| CD62L | DREG-56 | Maus | IgG1 | APC-Cy7 | Caltag |
| CD28 | CD28.2 | Maus | IgG1, k | Pe-Cy5 | BD |
| GITR | 110416 | Maus | IgG1 | FITC | R&D Systems |
| CTLA-4 | BNI-3 | Maus | IgG2a | Alexa 405 | DREZ |
| CD71 | M-A712 | Maus | IgG2a | PE-Cy5 | BD |
| CD25 | M-A251 | Maus | IgG1 | APC | BD |
| PD-1 | J116 | Maus | IgG1, k | PE | NatuTec |
| CD26 | L272 | Maus | IgG2a | PE | BD |
| CD27 | M-T271 | Maus | IgG1, k | FITC | BD |
| Granzym-B | CB9 | Maus | IgG1 | FITC | BD |
| Perforin | δ G9 | Maus | IgG2b | PE | BD |
| CD38 | HB7 | Maus | IgG1 | PE | BD |
| KIR NKAT2 | DX27 | Maus | IgG2a, k | PE | BD |
| KIR NKB1 | DX9 | Maus | IgG1, k | PE | BD |
| CCR7 | 3D12 | Ratte | IgG2a | PE | BD |

4.2 Zellkulturtechniken

Die Standardzelllinien wurden in DMEM (Invitrogen) und die T-Zelllinien und –klone in AIM-V Medium (Invitrogen) supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 30 μ M 2-Mercaptoethanol bei 37°C mit 8% CO₂ kultiviert. Die T-Zelllinien und –klone wurden unter Zugabe von 50 bis 100 U/ml IL-2 (Chiron, Ratingen) kultiviert. Die Kulturen wurden je nach Wachstumsverhalten regelmäßig auf frisches Medium überimpft. Die Zentrifugationsschritte zum Pelletieren und Waschen der Zellen wurden bei 300 x g 5 min durchgeführt. Es wurden Einwegmaterialien der Firma (BD, Heidelberg) verwendet.

4.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus Blut und Geweben

Den Blutproben wurde Heparin (Biochrom AG, Berlin) zugesetzt, um die Gerinnung zu vermeiden. Die Lymphozyten wurden mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten aus dem Blut isoliert. Ein Teil Ficoll Paque (Amersham, Freiburg) wurde mit zwei Teilen Blut vorsichtig überschichtet und 20 min bei 600 x g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten aus der Interphase wurden mit mindestens gleichem Volumen PBS gemischt und 5-10 min mit 300 x g zentrifugiert. Für die Isolierung von Lymphozyten aus Geweben wurden diese in PBS mit 0,1% BSA in kleinen Stücken zerschnitten und durch ein Sieb (Sigma, Taufkirchen) gedrückt. Anschliessend wurde die Suspension durch ein Filter (30 μ M Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) passagiert, um eine Einzellzellsuspension zu bekommen.

4.2.2 Cryokonservierung von Zellen

Für langzeitige Lagerung wurden die Zellen bei –140°C eingefroren. Dazu wurden diese in Einfriermedium suspendiert und für eine 1 h auf Eis gelagert. Danach wurden sie für eine Nacht auf –80°C und dann auf –140°C überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im Wasserbad (37°C) aufgewärmt und mit mindestens 10-fachem Volumen PBS verdünnt und zentrifugiert.

4.2.3 Zellseparation mittels magnetischer Beads

Die Zellen wurden zuerst mit fluorochrom-markierten Antikörpern für den gewünschten Selektionsmarker 5 min in 100 μ l MACS-Puffer auf Eis im Dunkeln gefärbt. Danach wurden die Zellen in mindestens 10 ml MACS-Puffer aufgenommen bei 4°C zentrifugiert. Dann

wurden die Zellen mit anti-FITC oder anti-PE Antikörper je nach Markierung des Primärantikörpers, die an magnetische Beads gekoppelt waren, 10 bis 15 min bei 4°C markiert. Nach dem Waschen wurde die Zellsuspension in 500 bis 1000 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die magnetische Säule (Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pipettiert. Die Säule war vorher einmal und nachher dreimal mit 500 bis 1000 µl MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde als Antigen-negative Fraktion gesammelt. Die auf der Säule verbliebenen Zellen wurden mit 3 bis 4 ml MACS-Puffer mit einem Stempel schnell herausgedrückt und als Antigen-positive Fraktion gesammelt. Die einzelnen Zellfraktionen wurden nachher zur Kontrolle durchflusszytometrisch analysiert.

4.3 Funktionelle T-Zellaktivitätsversuche

4.3.1 Chromfreisetzungsanalysen

Zur Bestimmung der zytolytischen Aktivitäten der CTL wurden die Zielzellen mit radioaktiven Chromium (^{51}Cr) beladen. Dazu wurden $1-2 \times 10^6$ Zielzellen in 100 µl DMEM mit 10% FCS aufgenommen und mit gleichem Volumen ^{51}Cr -Natriumchromatlösung (NEN, Zaventem, Belgien, $3,7 \times 10^7$ Bq/ml) gemischt und bei 37°C für 1h inkubiert. Danach wird die Zellsuspension auf 1 ml mit Medium aufgefüllt und 4-5-mal gewaschen, um überflüssiges ^{51}Cr zu entfernen. Für die Assays wurden in der Regel werden pro Ansatz 5000 Zielzellen in einem Volumen von 100 µl mit den zu testenden Peptiden gemischt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Beladen mit Peptiden erfolgte im Peptidbeladungsmedium (DMEM mit 0,1% BSA). Danach wurden die CTL zugegeben und die Kulturen 4-5 h im Brutschrank (37°C) inkubiert. Das Endvolumen von 200 µl sollte 10% FCS enthalten. Nach der Inkubation wurden 30 µl des Überstandes auf Fest-Szintillator-Platten überführt und die freigesetzte Radioaktivitätsmenge mit einem β -Counter (Packard, Dreieich) gemessen. Der Anteil an freigesetztem ^{51}Cr entspricht dem Anteil an lysierten Zielzellen. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische lyse (\%)} = \frac{(cpm_{\text{exp}} - cpm_{\text{bg}})}{(cpm_{\text{max}} - cpm_{\text{bg}})} \times 100$$

cpm_{exp} : Radioaktivität im experimentellen Ansatz

cpm_{max} : Radioaktivität nach Komplettlyse

cpm_{bg} : spontan freigesetzte Radioaktivität

Für die Spontanfreisetzung wurden die Zielzellen ohne CTL inkubiert. Die Totalfreisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen mit dem Detergenz Zaponin in Essigsäurelösung (Coulter Electronics, England) bestimmt.

4.3.2 ELISpot-assay

Spezifisch durch Peptide aktivierte T-Zellen können $IFN\gamma$ sekretieren, was in ELISpot-Assays so nachgewiesen wird, daß ein Rückschluss auf die Zahl der reagierenden T-Zellen möglich ist. Das von der Zelle sekretierte $IFN\gamma$ wird dabei durch auf die Assayplatte absorbierte spezifische Antikörper aufgefangen. Nach Entfernen der Zellen werden die Zytokine durch Gegenfärben mit einem zweiten $IFN\gamma$ -spezifischen Antikörper und einem Sekundärreagenz für eine enzymatische Reaktion in Form von Spots sichtbar gemacht. Alle Verdünnungen der Reagenzien wurden in PBS gemacht. Die kurzzeitigen Inkubationen zur Entwicklung der Nachweisreaktion erfolgte in geschlossener feuchter Kammer. Im einzelnen:

MultiScreen-IP®-96-Kavitäts-Platten (Millipore, Eschborn) wurden mit anti-Human- $IFN\gamma$ monoklonalen Antikörpern (Klon 2G1, PIERCE Endogen, Bonn) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird pro Kavität 50 µl Medium (X-VIVO 15®) zugesetzt. Dann werden die Stimulatorzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in 100 µl X-VIVO 15®-Medium (BioWhittaker, Apen) mit den Peptiden (10 µg/ml) für halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die CTL-Zellen zugegeben und die Platten für 16-20 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen dreimal mit PBS rausgewaschen. Weiterhin wird pro Kavität je 50 µl biotinylierter anti-Human- $IFN\gamma$ Antikörper (Klon B133.5, PIERCE Endogen, Bonn) in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS mit 4% BSA zugesetzt. Nach 2 h Inkubation in feuchter Kammer bei RT wurden nochmals dreimal gewaschen. Pro Kavität wurden 50 µl einer 1:2000 vorverdünnte Streptavidin-AP-Konjugatlösung (Roche, Mannheim) zugesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden dreimal gewaschen und am Ende mit 50 µl BCIP/NBT-Substratlösung (MOSS Inc.) inkubiert, bis Spots zu sehen waren (etwa 10 min). Die Platten werden dann getrocknet und die Spots mit einem BIOREADER-3000-ELISpot-Lesegerät ausgezählt.

4.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden phänotypische und funktionelle Eigenschaften der Lymphozyten untersucht. Mit monoklonalen Antikörpern, an die Fluorochrome gekoppelt sind, kann die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche und in der Zelle untersucht werden. Die Analysen erfolgten für 4-Farbenmessungen an einem FACS-CaliburTM (Beckton Dickinson, Heidelberg) oder für 8-Farbenmessungen an einem FACS-LSR II (Beckton Dickinson, Heidelberg). Zum Sortieren von Zellen wurden ein 8-Farben FACS-DIVA (Beckton Dickinson, Heidelberg) und ein 9-Farben Moflo (Cytomation, Freiburg) verwendet. Für die Auswertung wurden die Software CellQuestTM-Pro (Beckton Dickinson, Heidelberg), FlowJo Software (Versionen 4.2, 6 beta, Tree Star Inc) oder FACS-DIVA Software (Beckton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

4.4.1 Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und im selben Puffer wieder aufgenommen. Für jeden Ansatz wurden $1-10 \times 10^5$ Zellen mit bis zu 8 verschiedenen Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern (0,1-1,0 µg/ml) in einem Volumen von 25 bis 50 µl für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

4.4.2 Intrazelluläre Färbungen auf Zytokine

Zum Nachweis von Zytokinen, die nach spezifischer Stimulation exprimiert wurden, wurden die Zellen 5-10 min bei RT in einem isotonem Puffer mit Paraformaldehyd (PFA) (FACSTM Lysing Solution, Becton Dickinson, Heidelberg) fixiert. Danach erfolgte die Inkubation mit FACSTM Permeabilization Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) für 10 min im Dunkeln bei RT. Dieser Puffer enthält ebenfalls PFA sowie das Detergenz Zaponin, wodurch die Lipide aus der Zellmembran herausgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und analysiert.

4.4.3 Färbung von Tumor-spezifischen T-Zellen mit DimerX

DimerX (Beckton Deckinson) ist ein Fusionsprotein aus den drei extrazellulären Domänen der schweren Kette des HLA-A2 Moleküls und der V_H-Region von Maus-IgG1 (Dal Porto, et

al., 1993). Das Fusionsprotein wurde zusammen mit humanem β 2-Mikroglobulin in der J558-Plasmazytomzelllinie der Maus (ATCC TIB-6) exprimiert. Das HLA-A2-IgG1-V_H-Fusionsprotein und β 2m sind nicht-kovalent assoziiert. Das exprimierte Fusionsprotein wurde aus Zellkulturüberständen durch Affinitätschromatographie an Protein A gereinigt. DimerX kann spezifisch mit Peptiden beladen und so als Nachweisreagenz für T-Zellen mit den korrespondierenden Spezifitäten eingesetzt werden. Hierzu wurden 2 μ l DimerX über Nacht bei 26°C mit 1,5 μ l in PBS 1:10 vorverdünnten Peptidlösung (20 mg/ml) beladen. Am nächsten Tag wurde das Peptid-beladene DimerX mit Zenon-PE (Molecular Probes) markiert und unmittelbar für die Färbung eingesetzt. Zenon-PE ist ein anti-Maus IgG1-F_(ab)-Fragment mit PE als Fluorochrom.

Das frisch eingefrorene, primäre Tumormaterial wurde nach dem Auftauen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 5 min bei RT mit Beriglobin A (Aventis) inkubiert, um die Fc-Rezeptoren zu blocken. Danach wurde die mit Zenon-PE markierte DimerX-Färbelösung zugegeben und die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die direkt markierten Antikörper für die Oberflächenfärbung auf weitere Marker zugegeben. Nach 15 min wurden die Zellen mit 3-4 ml FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

4.4.4 Sortieren von Zellen per Durchflusszytometrie

Da mit magnetischen Separationstechniken keine saubere Separation der gewünschten Zellpopulationen möglich ist, wurde zusätzlich das durchflusszytometrische Zellsortiergerät FACS-DIVA (Beckton Dickinson) eingesetzt. Diese Arbeiten wurden am Durchflusszytometriezentrum von Thoralf Kaiser und Katharina Raba durchgeführt. Die Zellen wurden nach Färbung mit den entsprechenden Antikörpern gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Geräte ermöglichen das Sortieren von 4 unterschiedlichen Populationen anhand von bis zu 8 unterschiedlichen phänotypischen Merkmalen.

4.5 Molekulargenetische Arbeitsmethoden

4.5.1 Präparation genomischer DNA

Für die molekulargenetischen Untersuchungen der T-Zelllinien und -klone wurde die genomische DNA aus $1-10 \times 10^5$ kultivierten Zellen bzw. 10 Schnitten (jeweils 10 μ m)

paraffinisierter Hautbiopsien präpariert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, die Zellsedimente kurz aufgeschüttelt und in Extraktionspuffer (10mM TRIS/HCL pH 8,3; 50 mM KCL; je 0,45% Nonidet P40 und Tween 20) aufgenommen. Anschließend wurden 10 µg/ml Proteinase K hinzugefügt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben für 15 min auf 95°C erhitzt, womit die Enzymreaktion beendet wurde. Fixierte Hautbiopsien mußten vor der Präparation der genomischen DNA deparaffiniert werden. Die zweimalige Extraktion des Paraffins erfolgte mit 1 ml Xylen und 1 ml Ethanol. Die Proben wurden danach getrocknet und die DNA wie oben beschrieben präpariert.

4.5.2 TCR-γ-PCR

Für die Analyse der TCRγ-Rearrangements der kultivierten T-Zellklone wurde eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden für die unterschiedlichen Vγ- und Jγ-Gensegmente durchgeführt. Das gleiche Verfahren wird für die Routinediagnostik verwendet, sodass die Ergebnisse untereinander verglichen werden können. Abhängig von dem TCRγ-Rearrangement des dominant expandierten Klons in der Haut wurden für die Analyse der T-Zellklone die Oligonukleotide VG1, VG2, VG9 und JG12-a bzw. JGP12-i (**Tabelle 4**) verwendet. Die Reaktion wurde jeweils in einem Volumen von 75 µl mit 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer, Weiterstadt), 1,75 U Taq Polymerase (Perkin Elmer), 200 µM dNTP (Endkonzentration von jeweils ATP, CTP, GTP und TTP; GIBCO BRL), 50 pM je Oligonukleotid (BioTez, Berlin) und 2-10 µl DNA-Extrakt durchgeführt. Für die Amplifikation wurden die Proben zunächst für 4 min bei 94°C denaturiert, anschließend folgten 40 Zyklen von jeweils 1 min bei 94°C, 58°C und 72°C, sowie eine abschliessende Extension für 5 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%-igen Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Alle Proben, die eine deutliche Bande zwischen 240-260 Basenpaare aufwiesen, wurden in der Heteroduplex-Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (HD-TGGE) oder Fragmentlängenanalyse mit einem DNA-Sequenziergerät weiter analysiert.

4.5.3 Heteroduplex-Temperaturgradienten-Gelelektrophorese

Das Hybridisierungsprodukt von zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden wird als Heteroduplex bezeichnet. Die Wanderungsgeschwindigkeit solcher Heteroduplices in einem Temperaturgradienten ist im Vergleich zu einem Homoduplex – dem Hybridisierungsprodukt komplementärer Oligonukleotide - verändert, da ihre Thermostabilität verringert ist. Einzelstränge, die nicht hybridisiert sind wandern schneller und nur partiell hybridisierte

Oligonukleotide wandern langsamer als die Homoduplices. Diese Eigenschaft kann für die Analyse der klonalen Dominanz in einer Probe durch eine Heteroduplex-Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (HD-TGGE) ausgenutzt werden (Muche, et al., 1997). Für die Heteroduplex-Formation wurden die PCR-Produkte für 10 min auf 95°C erhitzt, innerhalb von 20 min auf 55°C abgekühlt und dann in eine Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Produkt von Proben mit klonal expandierten T-Zellen zeigte eine distinkte Bande, oligo- oder polyklonale Produkte zeigten einen Schmier.

4.5.4 Sequenzierung der klonal dominanten PCR-Banden

Die klonalen Banden aus der HD-TGGE wurden aus dem Gel herausgeschnitten und über Nacht in PCR-Puffer extrahiert. Anschliessend wurden die PCR-Produkte bei gleichen Bedingungen mit den Oligonukleotiden JG12-i oder JGP-12i anstelle von JG12a oder JGP12-a (**Tabelle 4**) reamplifiziert und mit dem *Qiagen PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Sequenzierung erfolgte entweder direkt oder nach dem Klonieren der PCR-Produkte mit dem *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer, Weiterstadt) an einem automatischen DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer). Dafür wurden die Oligonukleotide VGseq, JG12-i oder JGP12-i verwendet. Für die Klonierung einzelner Proben wurde *AT Cloning Kit* (Invitrogen, Fleck, Holland) benutzt. Die Sequenzen wurden mit den veröffentlichten Sequenzen der TCR γ V- und J-Segmente verglichen, um die klontypischen N-Regionen zu identifizieren und zu analysieren.

4.5.5 AT-Klonierung

Bei der DNA-Synthese mit Taq Polymerase hängt am 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenosin über. Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um die PCR-Produkte in ein linearisiertes Plasmid mit einem überhängenden Thymidin an den 5'-Enden zu ligieren. Die Ligation wird mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Benachbart zur Insertionsstelle befinden sich Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Die Plasmide werden in kompetenten Bakterienzellen kloniert. Nach der Präparation der Plasmid-DNA wird das PCR-Produkt mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die nicht im Insert schneiden, herausgeschnitten und sequenziert.

4.5.6 Isolierung von RNA

RNA wurde mit *Ready to go kit* (Qiagen, Hilden) aus 3 bis 5 x 10⁶ Zellen nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Alle Gefäße und das Wasser für RNA-Isolierung wurden vorher mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Roth, Karlsruhe) behandelt. Anschließend wurde die RNA vor der cDNA-Synthese mit RNase-freier DNase (Promega) für 30 min bei 37°C behandelt (1 U DNase pro 1 µg RNA). Nach anschließender Fällung und dem Waschen in 75%-igem Ethanol wurde die RNA in DEPC-Wasser aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt. Die RNA wurde bei –80°C gelagert.

4.5.7 PCR-Primer

Alle Oligonukleotide wurden von Biotex, Berlin bezogen. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide sind in **Tabelle 4** und **5** gelistet.

Tabelle 4: **Primer für TCR γ -PCR-Analyse (Muche, et al., 1997).**

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') | Spezifität | Position |
|-------------|-----------------------|------------------------|-----------------|
| VG1 | CTCCATCCACTGGTACCT | Vg1,2,3,4,5,5p,6p,7p,8 | 104-121 |
| VG9 | ATTGGTATCGAGAGAGAC | Vg9 | 121-138 |
| VG2 | CACTGGTACKKGCAAGAAAC* | Vg10,11,B,(A) | 111-129/117-135 |
| JG12-a | CAACAAGTCTTGTTCAC | Jg1,2 | 27-44 |
| JG12-i | TGTTGTTCCACTGCCAAA | Jg1,2 | 20-37 |
| JGP12-a | CTTGAGCYTAGTCCCTT | JgP1,P2 | 31-48 |
| JGP12-i | CCTTYWGCAAAYRTCTTGA* | JgP1,P2 | 16-35 |
| VGseq | AGRCCCCACAGCRTCTTC* | Vg1,2,3,4,5,5p,6p,7p,8 | 136-153 |

*K = G oder T; R = A oder G
W = A oder T; Y = C oder T

TABLE 1. Summary of the 1000 Genomes Project

| Gen | Leserichtung | Sequenz (5'-3') | Annealing- temperatur | Amplifikatgröße (bp) |
|-----------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| NDRG-1 | sense | ATGCAGGATGTAGACCTCGC | 58°C | 423 |
| | antisense | TAGGCGCCTGCTCCTGTTC | | |
| Tumorangiogenese Protein | sense | CCAGCAGTACTTTGGTGGACGAG | 58°C | 392 |
| | antisense | GCAGATGCCTGCTCCAGGTAG | | |
| Ceramidase | sense | AGCATCATGGCTGGCAGCCTCAC | 62°C | 335 |
| | antisense | GAGAGCAGCAGCATCTGTCATGGC | | |
| TGF-β | sense | GCCCTGGACACCAACTATTGC | 58°C | 335 |
| | antisense | GTGCGCTCCTGCAGGTGCAGC | | |
| IL-10 | sense | GCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCC | 58°C | 409 |
| | antisense | GTTGATGAAGATGTCAAACCTCAC | | |
| β-Actin | sense | AGGAGAAGCTGTGCTACGTC | 58°C | 454 |
| | antisense | CTCGTCATACTCCTGCTTGC | | |

4.5.8 cDNA-Synthese

1 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit jeweils 1 µl Oligo-dT-Primer (AAGCTGTGGTAACAACGCAGAGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT VN, V ist A, C, oder G, N sind beliebige Nukleotide) bei 70°C für 2 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurde 1 U Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen), 4 µl *first strand*-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (enthält je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2 µl DTT (20mM/ml) und 2,4 µl MgCl₂ (25mM/ml) hinzugefügt und mit DEPC-Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei RT und danach 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 72°C für 10 min denaturiert. Die Lagerung der Produkte erfolgte bei -20°C.

Für die Genexpressionensanalysen wurden die RT-PCR mit mRNA-spezifischen Primern durchgeführt (**Tabelle 5**). Alle Reagenzien für den PCR-Ansatz wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Der PCR-Ansatz z.B. für 50 µl Volumen setzte sich folgendermassen zusammen:

| | |
|----------------------------|--------|
| 10xPCR-Puffer | 5 µl |
| dNTP-Mix | 2 µl |
| Sense-Primer (50pM/µl) | 0,5 µl |
| Antisense-Primer (50pM/µl) | 0,5 µl |
| Taq-Polymerase (4U/ml) | 0,5 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1,5 µl |
| cDNA | 2 µl |
| H ₂ O | 38 µl |

Der PCR-Ansatz wurde nach folgendem PCR-Programm für 30 Zyklen amplifiziert, wobei die Annealingtemperatur abhängig von jeweiligen Primer variierte.

PCR-Protokoll:

| | |
|-------|---|
| 2 min | 95°C |
| 30 s | 95°C |
| 30 s | Annealingtemperatur |
| 45 s | 72°C (Rücksprung auf Schritt 2, Zykluswiederholung) |
| 5 min | 72°C |

Zur Identifikation wurde das RT-PCR-Produkt in einem 2% igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) bei 120 V aufgetrennt und gegebenenfalls sequenziert.

5 Experimente und Ergebnisse

5.1 Identifizierung von Tumor-spezifischen T-Zellepitopen

Für die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen werden Tumorzellen und Tumor-spezifische T-Zellen benötigt, wobei je nach Methode unterschiedliche Materialien und Informationen erforderlich sind. Für den biochemischen Ansatz werden sehr große Mengen an reinen Tumorzellen gebraucht, die für kutane Lymphome nicht verfügbar sind, da große Tumoren nur ausserordentlich selten vorkommen und die Tumorzellen nicht in Kultur etabliert und expandiert werden können. Bioinformatische Ansätze setzen die Kenntnis von Tumor-assoziierten Antigenen voraus. Da bei kutanen Lymphomen solche Antigene nicht bekannt sind, lässt sich diese Methode hier nicht anwenden. Für das molekulargenetische Vorgehen mit Klonieren von Expressionsbibliotheken sind langzeitstabile T-Zellklone als Indikatorzellen erforderlich, die bei kutanen Lymphomen nicht zugänglich sind. Wegen dieser Einschränkungen wurde für diese Arbeit der vierte Ansatz zur Bestimmung von T-Zellepitopen mittels kombinatorischen Peptidbibliotheken gewählt. Da T-Zellen in ihrer Antigenerkennung sehr degeneriert sind, ergeben die Analysen der Reaktionen von polyklonalen T-Zelllinien auf die randomisierten Peptidgemische keine definierten Reaktionsprofile. Tumor-infiltrierende T-Zellen sind immer polykonal und nicht notwendigerweise Tumor-spezifisch. Daher müssen für diesen Ansatz monospezifische Klone generiert und die Tumor-Spezifität dieser Klone belegt werden.

5.1.1 Generierung von Tumor-reaktiven CTL-Klonen

Zur Etablierung von Tumor-spezifischen T-Zellklonen wurden $CD8^+$ -T-Zellen aus Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) per *limiting dilution* isoliert und expandiert. Die TIL wurden aus einem Tumor eines Patienten WeW von etwa 12 g isoliert. Nach Abtrennen der Haut- und Fettanteile und Dissoziation der verbliebenen Tumorareale wurde die Suspension durch ein Zellsieb passagiert und nach Waschen 300×10^6 Zellen gewonnen. Die $CD8^+$ -T-Zellen wurden per MACS isoliert und mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 0,3 Zellen zusammen mit 1,0 Zellen des nicht-fraktionierten Zellgemisches aus dem Tumor, das Tumorzellen als spezifische Stimulatorzellen enthielt, und 1×10^4 bestrahlten autologen PBMC pro Kavität in Zellkulturmedium mit 100 U/ml IL-2 als Wachstumsfaktor und PHA (1 µg/ml) als Mitogen ausgesät. Nach 2 Wochen waren in einzelnen Kavitäten Kolonien zu

sehen. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Kolonien jeweils einem Klon entsprechen, ergibt sich durch die Poisson-Verteilung als

$$p(m) = \frac{(u \times e^{-u})}{(1 - e^{-u})}$$

$p(m)$: Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität
 u: Frequenz ausgesäter Zellen

Bei einer Aussaatfrequenz von 0,3 Zellen pro Kavität beträgt die Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität $p(m)$ 86%. Diese Rechnung setzt voraus, dass jede Zelle tatsächlich einen Klon ergibt. Das ist in der Realität besonders bei Versuchen mit Primärmaterialien aus Patienten nicht der Fall, da die Zellen häufig aufgrund von Defekten nicht mehr proliferieren oder sich nicht an die Zellkulturbedingungen adaptieren können. Die Effizienz der Klonierung, d.h. der Prozentsatz an ausgesäten Zellen, die tatsächlich Klone ergeben, ist:

$$\text{Klonierungseffizienz (\%)} = \frac{N_{\text{Klone}}}{N_{\text{Aussaat}}} \times 100$$

N_{Klone} : Zahl wachsender Klone
 N_{Aussaat} : Zahl ausgesäter Zellen

Im vorliegenden Versuch wurden 1920 Kavitäten beschickt. 68 Kolonien sind ausgewachsen, was einer Klonierungseffizienz von 12% entspricht. Mit der Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität von 86% ist zu erwarten, dass 59 dieser 68 Kolonien monoklonal sind, die anderen 9 wären bi- oder oligoklonal. Nach der Expansion wurden die ausgewachsenen Klone per Durchflusszytometrie auf ihre Phänotypen untersucht und erwiesen sich alle als CD8-positiv. Diese 68 Zellklone oder -linien wurden dann auf ihre Tumorspezifität untersucht.

5.1.2 Charakterisierung der CTCL-Tumorzellen

Zur Bestimmung der Tumorspezifität der CD8⁺-T-Zellen aus dem Klonierungsversuch ist es erforderlich, dass die Reaktion auf die Tumorzellen spezifisch gemessen werden kann, was wiederum voraussetzt, dass die Tumorzelle definiert werden kann. Aus immunhistologischen Untersuchungen war bekannt, dass die WeW-Tumorzelle einen T-Zellrezeptor der Familie V β 2 exprimiert. Die Grundlage für diese Zuordnung war, dass V β 2-positive T-Zellen eine dominante Zellpopulation im Tumor ausmacht. Keine andere T-Zellrezeptor-V-Familie war auffällig. Außerdem wiesen diese V β 2-positiven Zellen morphologische Besonderheiten auf: Sie waren besonders groß und hatten vielfach abnormale, d.h. hier konvolutierte Zellkerne. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellsuspension aus dem Tumor ergab auch hier eine Population im vorwärtigen Streulichtkanal (engl. *forward scatter*, FSC) stark lichtstreuende d.h. besonders grosse V β 2-positive Zellen (**Abb. 2A**). Diese Zellpopulation wurde per Durchflusszytometrie isoliert und einer molekulargenetischen Untersuchung der junktionalen Region der Gene für die T-Zellrezeptor- γ -Kette unterzogen. Hierzu wurde eine PCR mit den TCR-V γ -familienspezifischen Oligonukleotidprimer VG1, JG12a und JPG12i (**Tabelle 4**) in einem γ -1 Multiplex-PCR-Ansatz verwendet, wobei alle Mitglieder der V γ -Familien V γ 1, 2, 3, 4, 5, 5p, 6p, 7p und 8 erfasst werden. Ergänzend wurde ein γ -2 PCR Ansatz für alle Mitglieder der V γ 10, 11, B (A)-Familien mit den Oligonukleotidprimer VG2, JG12a und JPG12i angesetzt. Die TCR γ -PCR-Produkte wurden mit hochauflösender Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) aufgetrennt. Diese Technik wird auch in der Routinediagnostik für CTCL verwendet (siehe **Kap. 3.5.3**). Die Fragmentlängenanalyse der isolierten Tumorzellen zeigt, dass diese Zellpopulation bezüglich des TCR-V γ -Rearrangements monoklonal ist. Die Tumorzellen sind durch ein PCR-Produkt von 251 Basenpaaren gekennzeichnet. Die Sequenzierung ergab die Sequenz des klonspezifischen TCR-Rearrangements der Tumorzelle mit V γ 3 und J γ 2. Die N-Region der TCR-V γ -Kette war nur 1 Basenpaar (bp) lang. In ähnlicher Weise wurde die klonspezifische Sequenz der TCR-V β -Kette ermittelt. Das Gen für das TCR-V β besteht aus V β 2s1, J β s3 und einer 10 bp langen N-Region. Die Ergebnisse der PCR-Fragmentlängenanalyse für TCR-V γ der sortierten Tumorzellen ist in **Abb. 2B** gezeigt. **Abb. 2C** zeigt die Sequenzen der TCR-V β - und -V γ -Rearrangements. Das Rearrangement der TCR-V γ und der 1 bp-N-Region ist exakt die Sequenz, die in der molekulargenetischen Diagnostik für die Tumorzellen des Patienten bestimmt worden war. Diese sortierten und durch Abgleich mit den Daten der Diagnostik

bestätigten Tumorzellen wurden als Ziel- und Stimulatorzellen für die Assays mit den aus Tumor-infiltrierenden Lymphozyten isolierten CD8⁺-T-Zellklone verwendet.

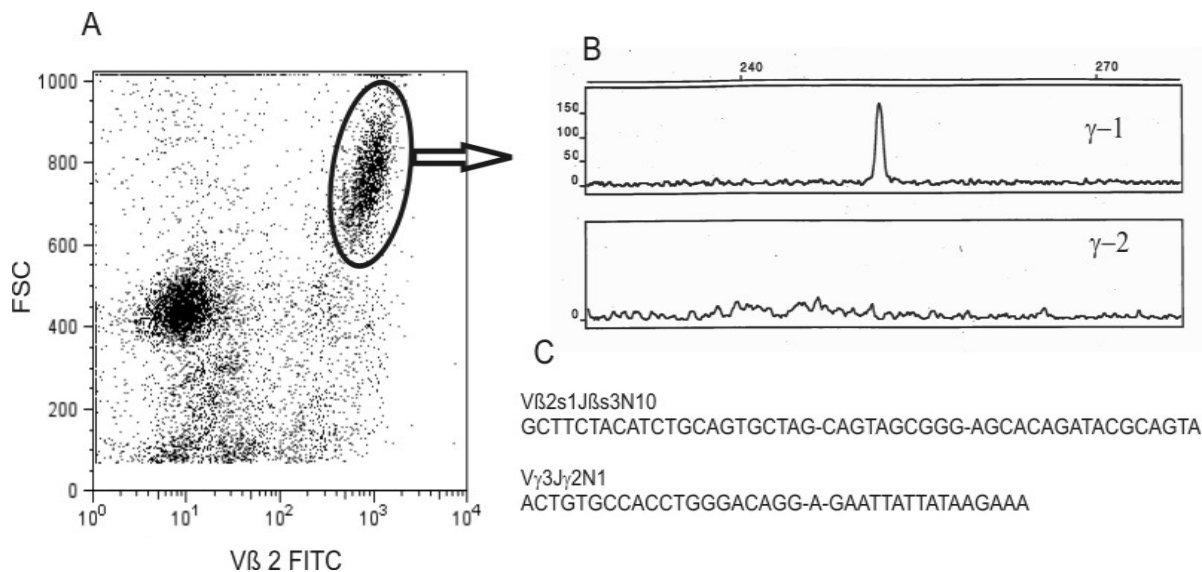


Abbildung 2: Isolierung von Tumorzellen. **A:** Die im Streulicht (FSC) gross erscheinende Tumorzellpopulation wurde an FACS-DIVA durchflusszytometrisch isoliert. **B:** TCR-Vγ-Fragmentlängenanalyse der isolierten Tumorzellen für die TCR-Vγ-Familien 1, 2, 3, 4, 5, 5p, 6p, 7p und 8 (γ-1) sowie 10, 11, B (A) (γ-2). **C:** Die Sequenzen für die N-Regionen der TCR-Vγ- und von TCR-Vβ-Rearrangements der Tumorzellen

5.1.3 Tumorspezifität der klonierten Tumor-infiltrierenden CD8⁺-T-Zellen

Für den Nachweis der Tumorspezifität der ausgewachsenen CD8⁺-T-Zellklone wurde zum Zeitpunkt der Tumorentnahme ohne *in vitro* Kultur eingefrorenes primäres Tumormaterial verwendet, wobei die Tumorzellen anhand ihrer Grösse mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-DIVA) isoliert wurden (**Abb. 2A**). Diese Sortierung nach der Zellgrösse ergab über 90% TCR-Vβ2-positive Tumorzellen. Danach wurden die Zellen mit ⁵¹Cr beladen und als Zielzellen für die Analyse der zytotoxischen Aktivität und der Tumorspezifität der T-Zellklone verwendet. Von den insgesamt 68 T-Zellklonen zeigten 3 Klone Tumorspezifität von denen 2 (CTL-Klone PN2 und L1) stabil in Kultur expandiert werden konnten (**Abb. 3**). Damit waren 4,4% von den *in vitro* ausgewachsen CD8⁺-T-Zellklonen tumor-reaktiv.

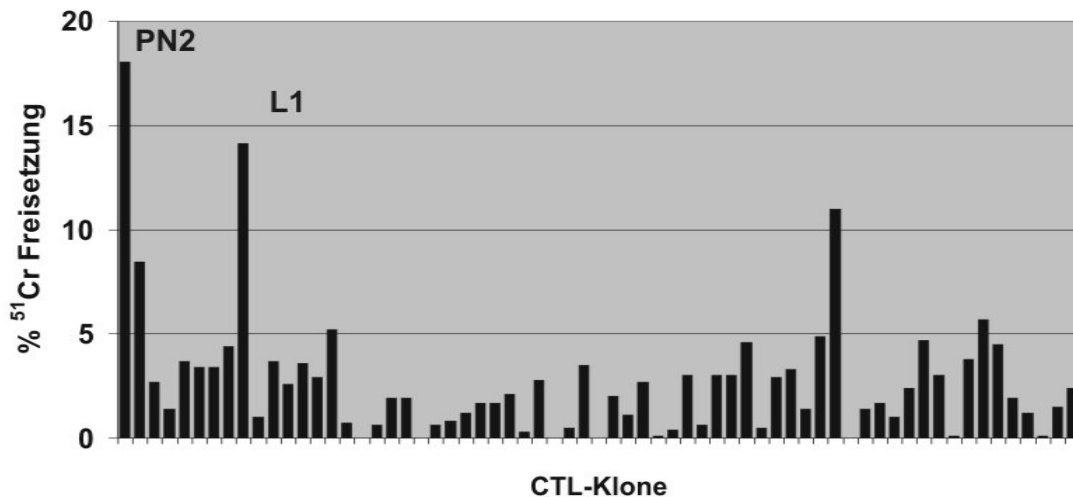


Abbildung 3: ^{51}Cr -Freisetzungsversuch mit den ausgewachsenen CD8^+ -T-Zellen aus TIL des Patient WeW. Als Zielzellen wurden Tumorzellen aus denselben Patienten verwendet, die anhand ihrer Größe an der FACS-DIVA isoliert worden waren; E/T-Ratio war 30/1.

Die TCR-V γ -Fragmentlängenanalysen von den zwei Tumor-spezifischen CTL-Klonen PN2 und L1 zeigten, dass diese jeweils 2 rearrangierte TCR-V γ -Gene hatten, die bilallelisch rearrangiert waren, obwohl nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die Proben jeweils zwei T-Zellklone enthalten.

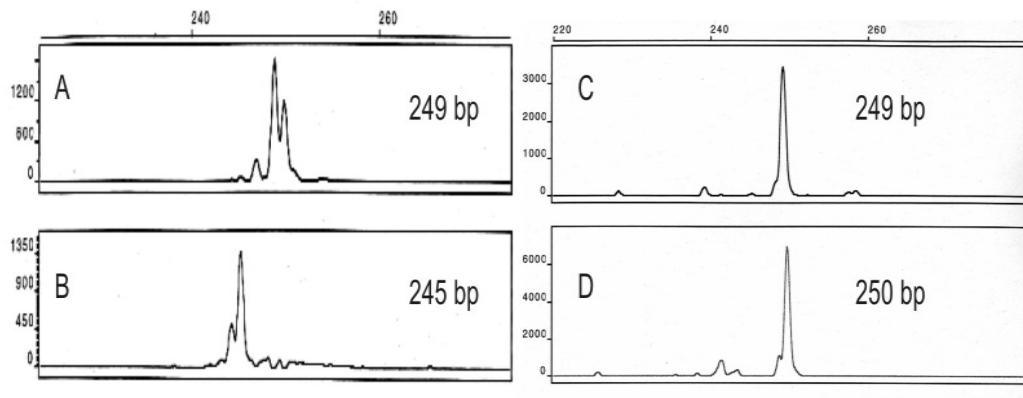


Abbildung 4: PCR-Fragmentlängenanalyse des CTL-Klons PN2 (A, B) und des CTL-Klons L1 (C, D). Die TCR-V γ -PCR-Produkte wurden mit den Primern VG1 (A, C) und VG2 (B, D) generiert. Die Sequenzen der Primer und die TCR-V γ -Familienspezifitäten sind in **Tabelle 4** aufgelistet.

Einer der CD8^+ -T-Zellklone, der aus dem Tumor des Patienten WeW isoliert wurde, aber nicht gegen die Tumorzellen reagierte, exprimierte denselben TCR-V β 2-Phänotyp wie der ursprüngliche CD4^+ -Tumorzellklon aus dem Hauttumor. Das TCR-V γ -Rearrangement dieses CD8^+ -T-Zellklons war ebenfalls identisch mit dem der Tumorzelle. Eine Analyse des TCR-

V β -Rearrangements ergab aber eine andere Sequenz für die junktionale Region. Während die Tumorzelle J β 2S3 hatte, war bei den T-Zellen J β 1S1 mit V β 2 rearrangiert. Die N-Regionsequenzen sind ebenso verschieden, wie die nachfolgend gezeigte Sequenzen der junktionalen TCR-V β -Region belegen.

J β 2s3 (J β -Rearrangement der Tumorzelle)

AGCACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCG

J β 1s1 (J β -Rearrangement des TCR-V β 2-positiven CD8⁺-T-Zellklons)

GACCAATGACGAGCTGTACTTTGGGCCAGGCACCAGGCTCACCGTGCTAG

Diese Beobachtung zeigt, dass das TCR-V γ -Rearrangement allein nicht in allen Fällen für die Definition des Tumorzellklons bei CTCL ausreichend ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unabhängige T-Zellklone das gleiche TCR-V γ -Rearrangement zu haben ist zwar sehr gering, aber dieses Beispiel zeigt, dass es durchaus vorkommen kann.

5.1.4 Die Spezifität des Tumor-reaktiven CTL-Klons PN2

Zur Identifizierung von spezifischen T-Zellepitopen für den Tumor-spezifischen Klon PN2 wurde die Reaktion dieser T-Zellen auf kombinatorische OX₈-Peptidbibliothek in ⁵¹Cr-Freisetzungsexperimenten untersucht. Als Zielzellen wurden die TAP-defiziente T2-Zelllinie gewählt, die mit dem Patient in der Expression von HLA-A*0201 übereinstimmt und als zweites MHC-Klasse-I-Molekül HLA-B5 exprimiert. Wegen des TAP-Defektes der T2-Zellen können die Peptide aus der zelleigenen Antigenprozessierungsmaschinerie nicht in die HLA-Moleküle gelangen. Als Folge wird HLA-B5 gar nicht, HLA-A*0201 nur schwach auf der Zelloberfläche exprimiert. Die schwache HLA-A*0201 Expression ist darauf zurückzuführen, dass Signalpeptide aus dem endoplasmatischen Retikulum an diese MHC-Moleküle binden können. Nach Inkubation der T2-Zellen mit exogenen Peptiden mit den Bindungsmotiven für HLA-A*0201 steigt die MHC-Expression an, da jetzt peptidfreie aber instabile HLA-A*0201-Molekül die Peptide binden können und stabilisiert werden. Dadurch

ist eine hohe Sensitivität beim Testen der kombinatorischen Peptidbibliotheken zu erreichen. Die T2-Zellen wurden eine halbe Stunde bei RT mit den Peptidbibliotheken (100 µg/ml) inkubiert, wobei die komplett randomisierte Bibliothek X₉ als negative Kontrolle und das Mitogen ConA (20µg/ml) als positive Kontrolle verwendet wurden.

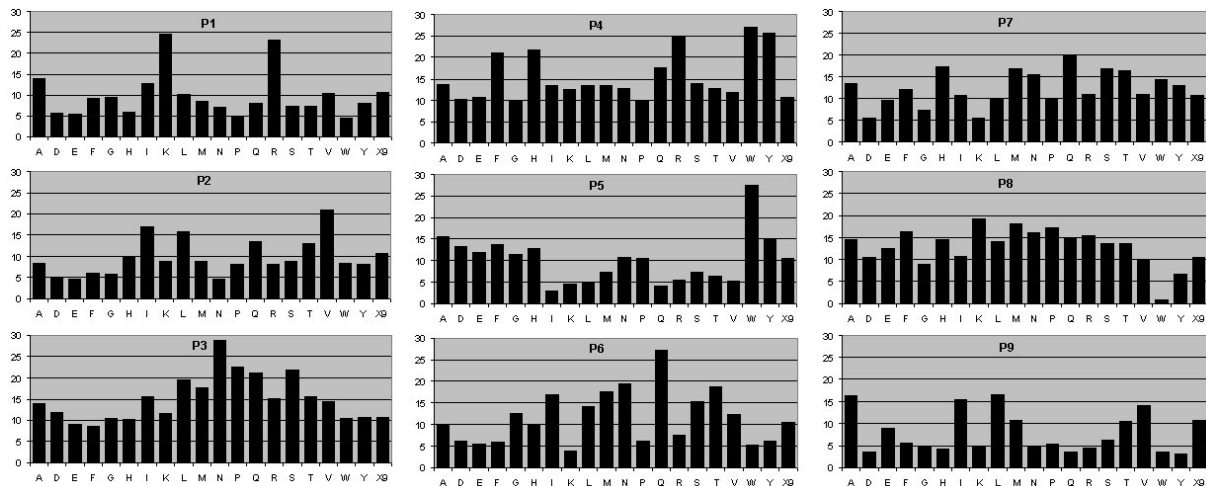


Abbildung 5: *Positional scan* mit dem Tumor-spezifischen CTL-Klon PN2. Auf der vertikalen Achse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmung von ⁵¹Cr-Freisetzungswerten in Prozent angezeigt. Die Buchstaben auf der horizontalen Achse geben die in der jeweiligen OX₈-Subbibliothek definierte Aminosäure an. P1 bis P9 bezeichnet die Sequenzposition im Peptid. E/T-Ratio war 30/1.

Die X₉-Bibliothek ist komplett randomisiert, d.h. sie enthält alle möglichen Nonapeptide. In der OX₈-Subbibliothek ist für die jeweiligen Sequenzposition P_n eine Aminosäure definiert. Ein erhöhter oder erniedrigter Wert für die Zytolyse gegenüber dem für X₉ zeigt einen positiven oder negativen Einfluss dieser Aminosäuren auf die Erkennung der Peptide durch die T-Zelle an. Alle Werte über den Wert von X₉ (hier 10,5%) werden als positiv bewertet. Für die Position 1 waren die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin am stärksten aktiv. Für Position 5 war Tryptophan eindeutig die aktivste Aminosäure. Für die HLA-Ankerpositionen 2 und 9 waren die in den Epitopdatenbanken beschriebenen Ankeramino-säuren Valin, Isoleucin, Leucin und Alanin positiv. Für einige Positionen wie 3, 4, 6, 7 und 8 waren mehrere Aminosäuren zum Teil vergleichbar stark aktiv. Aminosäuren mit geringerer Aktivität als die X₉-Bibliothek könnten entweder antagonistische Epitope sein oder keinen Effekt auf die T-Zelle haben (Null-Aminosäure). Daher sollten diese Aminosäuren bei der Erstellung der Epitope vermieden werden. In **Tabelle 6** sind die am stärksten aktiven Aminosäuren und die Null-Aminosäuren für die einzelnen Sequenzpositionen zusammengestellt.

Tabelle 6: **Ergebnis des *Positional scans* mit dem Tumor-spezifischen CTL-Klon PN2 mit kombinatorischen Peptidbibliotheken.**

| Position | bevorzugte Aminosäuren | | | | | Null-Aminosäuren | | | | | | | | | |
|----------|------------------------|---|---|---|---|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| P1 | K | R | | | | | | | | | | | | | |
| P2 | I | V | L | | | | | | | | | | | | |
| P3 | N | P | S | | | E | F | G | H | | | | | | |
| P4 | W | Y | R | H | F | I | K | L | M | Q | R | S | T | V | |
| P5 | W | | | | | | | | | | | | | | |
| P6 | Q | N | | | | D | E | F | K | P | R | W | Y | | |
| P7 | Q | M | T | H | | D | G | K | | | | | | | |
| P8 | K | M | F | | | W | Y | G | D | I | | | | | |
| P9 | A | L | I | V | | | | | | | | | | | |

Aus den Ergebnissen des *Positional scans* mit den kombinatorischen Peptidbibliotheken können definierte T-Zellepitope auf zwei unterschiedliche Arten abgeleitet werden:

1. Kombination der aktiven Aminosäuren für die einzelnen Sequenzpositionen, was zu Mimotopen führt.
2. Datenbanksuche auf Peptide, die zu dem Reaktionsprofil der T-Zelle passen.

Die Datenbanksuche mit den bevorzugten Aminosäuren aus **Tabelle 6** ergab keine Kandidatensequenzen für Epitope. Deswegen wurde eine Datenbanksuchmatrix mit den folgenden Eingaben erstellt:

- Für die Positionen 1, 2, 5, und 9, die relativ definierte Ergebnisse geliefert hatten, wurden die starken Aminosäuren als positive Suchkriterien eingegeben.
- Für die Positionen 3, 4, 6, und 7, die degenerierte Anforderungsprofile erbrachten, wurden die negativen bzw. Null-Aminosäuren als negative Suchkriterien eingegeben.
- Position 8, für die kein definiertes Ergebnis erhalten wurde, wurde offen gehalten, d.h. hier alle Aminosäuren zugelassen.

Die damit erstellte Matrix für die Datenbanksuche war

[KR]-[IVL]-{EFGH}-{IKLMQRSTV}-W-{DEFKPRWY}-{DGK}-X-[ALIV]

Eckige Klammern zeigen positive Suchkriterien und geschleifte Klammern negative Suchkriterien an. X steht für „beliebige Aminosäuren“. Mit der Matrix wurde in der

Datenbank <http://us.expasy.org/tools/scanprosite/> nach möglichen Treffern aus humanen Proteinen gesucht.

Die Matrixsuche erbrachte 236 Treffer. Zusätzlich wurden aus den bevorzugten Aminosäuren 8 Mimotope generiert, die in **Tabelle 7** fett markiert sind. Die insgesamt 244 Peptide wurden synthetisiert und für Verifizierungsexperimente eingesetzt. Dazu wurden T2-Zellen mit den Peptiden (10 µg/ml) 30 min bei RT inkubiert und zu den T-Zellen zugegeben. Die IFN γ -Produktion wurde im ELISpot-Assay anhand der *spot forming units* (SFU) quantifiziert. In der Tabelle ist nur die aktiven Peptide - alle 8 Mimotope (fett markiert in der Tabelle) und 91 der potentiellen natürlichen Epitope – dargestellt. Im **Abb. 16** sind alle getesteten Peptidsequenzen aufgelistet.

Tabelle 7: Potentielle Epitope für den CTL-Klon PN2. Als MHC-Bindungswerte wurden theoretische Scores für die Bindung der Peptide an HLA-A*0201 Molekül nach dem SYFPEITHI-Algorithmus berechnet und hier dargestellt. Die T-Zellaktivität wurde in *spot forming units* (SFU) für 1×10^6 Zellen angegeben. Für die beiden Oktapeptide konnte keine Scores für MHC-Bindung berechnet werden. Die Mimotope sind in fett dargestellt.

| Nr. | Sequenz | Score | SFU | | Nr. | Sequenz | Score | SFU |
|-----|------------|-------|------|--|-----|------------|-------|------|
| 6 | KADWWTNTA | 14 | 3300 | | 56 | RVNAWQAKA | 13 | 7000 |
| 12 | KICAWMQLA | 13 | 3000 | | 57 | RVRAWQRGA | 9 | 5600 |
| 13 | KINNWLNHA | 19 | 2100 | | 124 | KALQWVSAI | 20 | 6300 |
| 16 | KLAGWHRIA | 19 | 3900 | | 126 | KAPHWTNRI | 16 | 4900 |
| 21 | KLLGWTHTCA | 22 | 5600 | | 129 | KISNWTAAI | 22 | 1700 |
| 22 | KLQFWAVTA | 18 | 2700 | | 130 | KITWWLCAI | 21 | 3800 |
| 25 | KVIFWSALA | 12 | 1800 | | 145 | RANHWSAII | 15 | 4800 |
| 32 | RAKYWLERA | 10 | 3800 | | 152 | RLQHWLWSI | 24 | 3300 |
| 33 | RAKYWVERA | 10 | 4900 | | 153 | RVDFWTSTI | 15 | 3300 |
| 34 | RALWWAVGA | 13 | 6900 | | 254 | KILGWAWWL | 23 | 5300 |
| 39 | RILHWQRAA | 15 | 6000 | | 255 | KINNWIIVQL | 26 | 3100 |
| 40 | RINYWHLEA | 15 | 3100 | | 258 | KISGWTQAL | 24 | 6100 |
| 45 | RLIYWLTFa | 19 | 3800 | | 261 | KLDYWSFQL | 20 | 3900 |
| 46 | RLLGWSLPA | 19 | 5600 | | 262 | KLDYWSSQL | 20 | 300 |
| 47 | RLTFWTCLA | 14 | 1900 | | 267 | KLKFWTVDL | 23 | 5300 |
| 49 | RLVHWCHGA | 16 | 5700 | | 269 | KLLHWVSLI | 27 | 2800 |
| 50 | RLVYWLEVA | 17 | 600 | | 271 | KLNCWGSRL | 22 | 3300 |
| 53 | RVKGWAPRA | 10 | 2200 | | 274 | KLPHWTPTL | 26 | 5000 |
| 54 | RVLGWVAEA | 20 | 6900 | | 276 | KLRHWQQVL | 21 | 5100 |

| Nr. | Sequenz | Score | SFU | | Nr. | Sequenz | Score | SFU |
|------------|------------------|-----------|-------------|--|-----|-----------|-------|------|
| 277 | KLRNWHHGL | 23 | 2100 | | 466 | KIIPWNSRV | 23 | 1600 |
| 279 | KLSEWMESL | 25 | 4400 | | 469 | KIPGWQAEV | 25 | 4500 |
| 288 | KVINWQTSL | 19 | 4400 | | 472 | KITPWSSKV | 22 | 5300 |
| 329 | RITYWGQRL | 16 | 4800 | | 476 | KLAFWLLAV | 28 | 2500 |
| 331 | RLICWQALL | 24 | 6300 | | 478 | KLKFWTHCV | 22 | 4600 |
| 337 | RLLYWNRKL | 23 | 2600 | | 481 | KLLFWVTEV | 28 | 6200 |
| 338 | RLNFWQHKL | 23 | 3100 | | 482 | KLLYWNMAV | 23 | 1800 |
| 339 | RLNFWQQKL | 22 | 1000 | | 484 | KLPPWNPQV | 24 | 1200 |
| 340 | RLNWWQHKL | 24 | 3500 | | 490 | KVAFWLELV | 20 | 5100 |
| 341 | RLNWWQQKL | 23 | 2800 | | 502 | RADFWMPAV | 15 | 1800 |
| 346 | RLRHVVYLL | 25 | 2100 | | 503 | RAPFWGLRV | 14 | 4900 |
| 347 | RLSFWQHKL | 22 | 3900 | | 504 | RAQFWSAYV | 15 | 4800 |
| 348 | RLSFWQQKL | 21 | 3500 | | 507 | RASFWLALV | 19 | 5700 |
| 349 | RLSHWGRRRL | 20 | 3600 | | 508 | RAVFWIEFV | 17 | 2300 |
| 350 | RLSNWNISL | 22 | 5800 | | 509 | RIDWWGFRV | 18 | 4600 |
| 351 | RLSWWQHKL | 23 | 2600 | | 510 | RIPPWMEVV | 20 | 6800 |
| 352 | RLSWWQQKL | 22 | 4800 | | 511 | RIQFWIAAV | 24 | 5300 |
| 354 | RLVYWLHTL | 26 | 4100 | | 512 | RISAWQSPV | 18 | 3600 |
| 356 | RLYYWGLGL | 22 | 2700 | | 519 | RLNWWSTV | k.A. | 4700 |
| 357 | RVAAWVEAL | 21 | 5000 | | 520 | RLNWWVSV | k.A. | 4600 |
| 358 | RVAFWIIKL | 21 | 7200 | | 521 | RLQNWVYNV | 25 | 6700 |
| 359 | RVCCWTPRL | 17 | 1500 | | 522 | RLRAWGARV | 22 | 6400 |
| 361 | RVLDWVPKL | 24 | 1400 | | 523 | RLRWWQPFV | 21 | 1500 |
| 363 | RVLFWGRIL | 15 | 6100 | | 526 | RVCYWTIRV | 15 | 2200 |
| 364 | RVMGWVSGL | 22 | 4000 | | 527 | RVIFWSLYV | 16 | 2700 |
| 365 | RVNGWSLPL | 18 | 6100 | | 528 | RVLAWMFLV | 16 | 5800 |
| 366 | RVPAWGRCCL | 14 | 1500 | | 531 | RVLPWQAQV | 20 | 6300 |
| 367 | RVSWWGSTL | 16 | 4200 | | 532 | RVLYWIPVV | 20 | 4300 |
| 370 | RVVPWNVTL | 20 | 6100 | | 534 | RVSHWMLGV | 16 | 5800 |
| 458 | KAAYWASQV | 16 | 4100 | | 535 | RVVGWSNIV | 17 | 6100 |
| 459 | KAKYWSSNV | 13 | 5300 | | | | | |

Allgemein steht, dass für die T-Zellaktivität nicht nur die MHC-Ankerpositionen sondern auch andere Aminosäurepositionen des antigenen Peptids, die direkt mit TCR in Kontakt stehen, entscheidend sind. Zum Beispiel das Peptid 523 mit einem guten MHC-Score von über 20 wurde schlechter erkannt als das Peptid 34 mit einem geringeren MHC-Score. Desweiteren wurden zum Teil sehr ähnliche Peptide von Klon PN2 unterschieden.

5.1.5 Expressionsanalysen für die potentielle WeW-Tumor-spezifische TAA

Um festzustellen welche der Proteine, die potentielle Epitope für PN2 enthalten, wirklich in den Tumorzellen des Patienten WeW exprimiert werden, wurde eine RT-PCR mit cDNA aus den Tumorzellen und spezifischen Primern für die Transkripte der 91 Proteingene durchgeführt. Die Proteinquellen für die aktiven Peptide sind im **Anhang** dargestellt. Von den insgesamt 91 Proteinen wurden 59 auf ihre Expressionen untersucht. Manche Proteine haben keine Introns und zu einigen davon gibt es Pseudogene mit hohen Homologien zu den mRNA. Als Quelle für die cDNA wurde Tumorzellen des Patienten, die anhand ihrer Grösse per Durchflusszytometrie isoliert wurden, verwendet. Aus den isolierten Zellen wurde zuerst RNA mit *Ready to go kit* (Qiagen) isoliert und dann mit oligo-dT Primer in cDNA umgeschrieben. Vor der cDNA-Synthese wurden die Proben mit RNase-freier DNase (Promega) behandelt, um genomische Kontaminationen zu entfernen. Die Sequenzen für das Design der cDNA-spezifischen Primer wurde aus der Nukleotiddatenbank *BLAST* übernommen. Die 5'- und 3'-Primer wurden so gewählt, dass sie auf verschiedenen Exons binden. Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzabgleich mit der Humangenomdatenbank geprüft. Die Schmelztemperatur und GC-Gehalt wurden mit dem Programm *DNA STAR* Version 5.03 (DNA STAR Inc., Madison, USA) abgeschätzt und so eingestellt, dass für alle Primerpaare etwa vergleichbare Schmelztemperaturen gegeben waren. Die PCR-Amplifikatgrössen lagen zwischen 300 und 600 Basenpaaren. Da die PCR nicht für alle Primerkombinationen notwendigerweise optimal eingestellt und die Menge an cDNA begrenzt war, bedeutet ein negatives Ergebnis nicht unbedingt, dass tatsächlich kein Transkript vorliegt. Umgekehrt ist ein positives Ergebnis sicher. Drei der PCR-Ansätze ergaben positive Signale und sind in **Abb. 6** dargestellt. Die PCR-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert (Firma AGOWA). Die Sequenzdaten bestätigten die Ursprungsproteine. Die damit identifizierten Proteine sind: Tumorangioese-Protein, Glucosylceramidase und *N-myc downstream regulated gene 1* (NDRG-1). Tumormaterialien von 4 weiteren Patienten, für die ausreichend Tumormaterial verfügbar war, wurden auf die Expression dieser Proteine untersucht. NDRG-1 war in 5 von 5, das Tumorangioese-Protein in 4 von 5 und die Ceramidase in 5 von 5 Fällen exprimiert. Diese drei Proteine könnten tatsächlich TAA für CTCL sein und damit die drei aus ihnen abgeleiteten Epitope auch Tumor-assoziierte T-Zellepitope für CTCL.

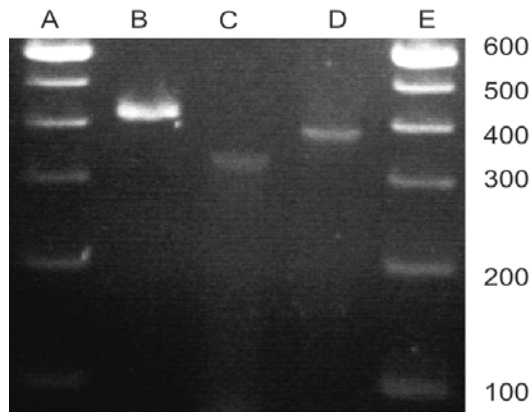


Abbildung 6: RT-PCR-Analyse von Tumorzellen des Patienten WeW, die als Zielzellen für den Tumorspezifitätstest mit den 2 Tumor-spezifischen CTL-Klonen benutzt wurden. B: NDRG-1 (423bp); C: Glucosylceramidase precursor (335bp); D: Tumorangiogenese Protein (392bp); A, E: 100 bp DNA-Marker.

5.1.6 Spezifität des Tumor-reaktiven CTL-Klons L1

Das Spezifitätsprofil vom Klon L1 wurde wie das für Klon PN2 mittels *Positional Scan* mit den kombinatorischen Peptidbibliotheken bestimmt. Klon 1 zeigte eine geringere zytolytische Aktivität in dieser Analyse als Klon PN2. **Abb. 7** zeigt die Ergebnisse des *Positional Scans*. Die Werte für Position 1 waren schwach. Die HLA-Ankermotive Leucin, Methionin und Valin in Positionen 2 waren alle relativ wenig aktiv. In Ankerposition 9 hingegen gaben diese Aminosäuren klar positive Signale. In Position 3 hatten Alanin und Isoleucin bessere stimulatorische Aktivität als Valin, Methionin, Prolin und Glycin. In Position 4 hatten Histidin, Isoleucin, und Lysin scheinbar antagonistische Effekte. Es gab hier keine ^{51}Cr Freigesetzung. Tryptophan war die effektivste Aminosäure in Position 5, während Phenylalanin negativ war. Tryptophan, Tyrosin, Methionin, Leucin waren in Position 6 etwa gleich stark aktiv und Phenylalanin, Isoleucin, Prolin, Valin und Glycin etwa gleich schwach. In Position 7 waren die drei polaren, ungeladenen Aminosäuren Serin, Threonin und Glycin aktiv. Position 8 war stark degeneriert.

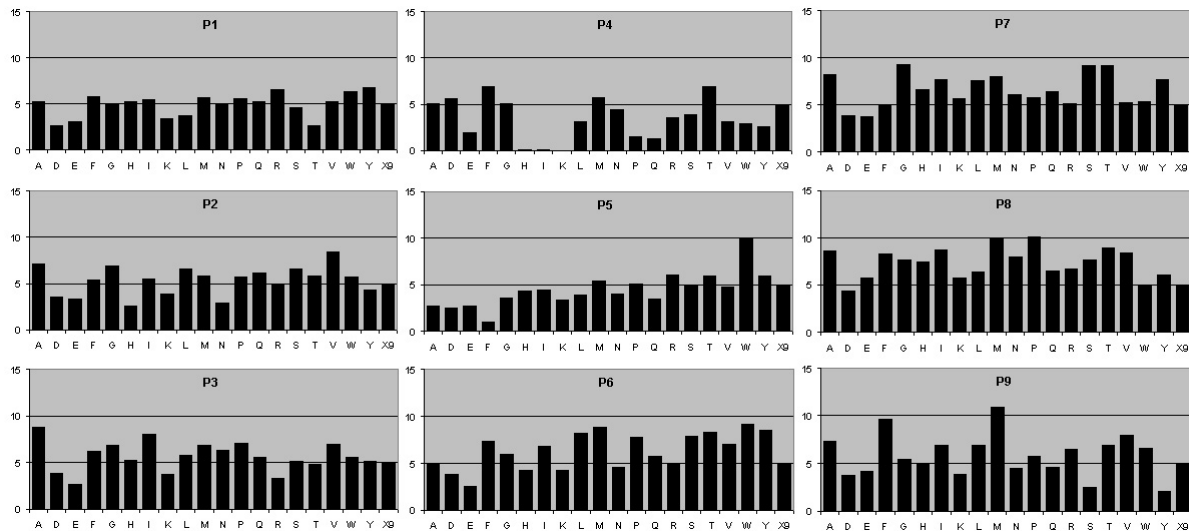


Abbildung 7: *Positional Scan* mit dem CTL-Klons L1. Die Werte für ^{51}Cr -Freisetzung (vertikale Achse) sind als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dargestellt. Die Buchstaben auf der horizontalen Achse geben die in der jeweiligen OX_8 -Subbibliothek definierten Aminosäuren an. P1 bis P9 bezeichnen die Sequenzposition im Peptid. E/T-Ratio war 30/1.

Tabelle 8 fasst die aktiven Aminosäuren zusammen. Trotz der insgesamt schwachen Signale konnten aus den bevorzugten Aminosäuren 64 potentielle Epitope durch Kombinatorik abgeleitet werden (**Tabelle 9**). Für die Erstellung der Epitopkandidaten wurden Aminosäuren mit der Aktivität von 1 bis 2 fachen Standardabweichung über den X_9 -Wert ausgewählt. Für die HLA-Ankerposition 2 und 9, für die keine eindeutig positiven Aminosäuren gefunden wurden, wurde jeweils Leucin ausgewählt, um die Anzahl der Peptide reduzieren und gute MHC-Bindung zu erreichen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse für das *Positional Scan* des Klons L1

| Position | Ergebnis aus <i>Positional Scan</i> | | MHC-Ankerposition |
|----------|--|---|-------------------|
| P1 | R | Y | |
| P2 | | | L |
| P3 | A | I | |
| P4 | F | T | |
| P5 | W | | |
| P6 | W | Y | |
| P7 | G | S | |
| P8 | M | P | |
| P9 | | | L |

Neben den Mimotopen wurden Peptide aus natürlichen Proteinquellen gesucht, wobei diese Datenbanksuche im Gegensatz zu Klon PN2 ausschliesslich mit positiven Suchkriterien durchgeführt wurden. Zwei potentielle Epitope wurden gefunden. Eine Peptidsequenz YLVTWPATA aus einer Integrin-4 β D-Splice-Variante und eine zweite Peptidsequenz RAMMTMAVL aus der *env*-Region des humanen endogenen Retrovirus HERV-K10. Die spezifische Splice-Variante von Integrin-4 β D konnte im Tumor des Patienten WeW nicht nachgewiesen werden. Die Expression von *env* aus HERV-K10 erfordert, dass das Virusgenom transkribiert und die zwischen dem LTR und *env* gelegenen *pol*- und *gag*-Regionen herausgespleisst werden (Wang-Johanning, et al., 2003). Die Virus-DNA konnte in Volllänge auf genomischer Ebene in den Tumorzellen des Patienten WeW nachgewiesen werden. Eine detaillierte PCR-Analyse mit Primern aus den LTR und *gag* bzw. *env* ergab aber, dass das Transkript nicht gespleisst war und daher *env* nicht als Protein exprimiert sein konnte. Damit ist es nicht möglich, dass das *env*-Epitop durch Prozessierung des *env*-Proteins entsteht. Mit diesen RT-PCR-Analysen wurde gezeigt, dass die Quellproteine für die beiden potentiellen natürlichen Epitopen in den Tumorzellen des Patienten WeW nicht vorkommen und damit nicht Ursprung der Epitope sein können.

Für die beiden natürlichen Epitope wurden Mimotope konstruiert und ebenso wie ihre natürliche Korrelate getestet. Durch Einführung von Leucin in die MHC-Ankerposition 9 wurden Peptide mit potentiell guter Bindung an HLA-A*0201 generiert. Ausserdem wurde zu einem der Mimotopen ein potentieller Antagonist mit Histidin in Position 4 generiert (Peptid Nr.69). Die insgesamt 69 synthetischen Peptide (64 Mimotope, 2 potentielle natürliche Epitope mit entsprechenden Mimotopen und 1 Antagonist) wurden sowohl im ⁵¹Cr-Freisetzungsversuch als auch auf IFN γ -Produktion (ELISpot) auf ihre Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, untersucht (**Tabelle 9**). Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der beiden Effektorfunktionen. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurden diese normalisiert und graphisch dargestellt (**Abb. 8**). Für 43 der Peptide korrelierte die IFN γ -Synthese mit der zytolytischen Aktivität, d.h. die T-Zellen reagierten in beiden Assays vergleichbar auf die Peptide nur mehr oder weniger stark. Dies war nicht der Fall bei den Peptiden 49, 53, 56 und 63. Trotz hoher zytolytischer Aktivität wurde kein IFN γ induziert. Bei Peptid 55 war maximale Zytolyse bei schwacher IFN γ -Ausschüttung zu sehen. 21 Peptide induzierten IFN γ -Synthese aber keine zytolytische Aktivität. Die Peptide 54 und 50 wurden schwach oder gar nicht erkannt.

Tabelle 9: **Aktivität des CTL-Klons L1.** Die Werte für Zytolyse sind in % netto-⁵¹Cr-Freisetzung angegeben, d.h. ⁵¹Cr-Freisetzungswert ohne Peptid (4,6%) ist abgezogen. Die Werte für IFN γ -Synthese sind in SFU pro 1×10^6 Zellen angegeben, wobei der Basiswert für IFN γ -Synthese, d.h. ohne Peptid (48 SFU) abgezogen ist. Die natürlichen Epitope sind in fett und der Antagonist in kursiv gezeigt.

| Nr. | Sequenz | Zytolyse | SFU | | Nr. | Sequenz | Zytolyse | SFU |
|-----|-----------|----------|-----|--|-----------|------------------|-------------|------------|
| 1 | RLAFWWGML | 0,00 | 310 | | 36 | YLITWWGML | 10,92 | 800 |
| 2 | RLIFWWGML | 0,00 | 640 | | 37 | YLAFWYGML | 0,00 | 780 |
| 3 | RLATWWGML | 4,70 | 760 | | 38 | YLIFWYGML | 0,00 | 460 |
| 4 | RLITWWGML | 0,00 | 530 | | 39 | YLATWYGML | 8,01 | 960 |
| 5 | RLAFWYGML | 0,00 | 620 | | 40 | YLITWYGML | 2,75 | 280 |
| 6 | RLIFWYGML | 0,00 | 550 | | 41 | YLAFWWSML | 0,00 | 770 |
| 7 | RLATWYGML | 9,93 | 920 | | 42 | YLIFWWSML | 0,00 | 840 |
| 8 | RLITWYGML | 0,00 | 530 | | 43 | YLATWWSML | 6,58 | 730 |
| 9 | RLAFWWSML | 0,00 | 630 | | 44 | YLITWWSML | 6,26 | 750 |
| 10 | RLIFWWSML | 0,00 | 760 | | 45 | YLAFWYSML | 0,00 | 730 |
| 11 | RLATWWSML | 7,24 | 770 | | 46 | YLIFWYSML | 5,91 | 650 |
| 12 | RLITWWSML | 1,33 | 680 | | 47 | YLATWYSML | 11,14 | 930 |
| 13 | RLAFWYSML | 0,00 | 650 | | 48 | YLITWYSML | 4,33 | 400 |
| 14 | RLIFWYSML | 0,00 | 690 | | 49 | YLAFWWGPL | 6,24 | 0 |
| 15 | RLATWYSML | 7,64 | 890 | | 50 | YLIFWWGPL | 1,31 | 50 |
| 16 | RLITWYSML | 0,00 | 590 | | 51 | YLATWWGPL | 9,16 | 290 |
| 17 | RLAFWWGPL | 0,00 | 730 | | 52 | YLITWWGPL | 5,10 | 380 |
| 18 | RLIFWWGPL | 7,76 | 810 | | 53 | YLAFWYGPL | 2,42 | 0 |
| 19 | RLATWWGPL | 9,62 | 990 | | 54 | YLIFWYGPL | 0,00 | 0 |
| 20 | RLITWWGPL | 6,50 | 970 | | 55 | YLATWYGPL | 15,51 | 160 |
| 21 | RLAFWYGPL | 3,90 | 930 | | 56 | YLITWYGPL | 2,41 | 0 |
| 22 | RLIFWYGPL | 7,78 | 520 | | 57 | YLAFWWSP | 5,96 | 550 |
| 23 | RLATWYGPL | 13,40 | 990 | | 58 | YLIFWWSP | 7,38 | 750 |
| 24 | RLITWYGPL | 0,00 | 570 | | 59 | YLATWWSP | 15,19 | 1050 |
| 25 | RLAFWWSP | 2,62 | 500 | | 60 | YLITWWSP | 11,21 | 630 |
| 26 | RLIFWWSP | 0,75 | 790 | | 61 | YLAFWYSPL | 3,92 | 480 |
| 27 | RLATWWSP | 11,06 | 660 | | 62 | YLIFWYSPL | 0,60 | 430 |
| 28 | RLITWWSP | 7,04 | 580 | | 63 | YLATWYSPL | 4,66 | 0 |
| 29 | RLAFWYSPL | 9,70 | 440 | | 64 | YLITWYSPL | 10,28 | 600 |
| 30 | RLIFWYSPL | 10,18 | 650 | | 65 | YLVTWPATA | 3,34 | 710 |
| 31 | RLATWYSPL | 10,46 | 500 | | 66 | YLVTWPATL | 8,48 | 990 |
| 32 | RLITWYSPL | 9,85 | 220 | | 67 | RAMMTMAVL | 0,00 | 810 |
| 33 | YLAFWWGML | 8,31 | 560 | | 68 | RLMMTMAVL | 0,00 | 620 |
| 34 | YLIFWWGML | 5,61 | 490 | | <i>69</i> | <i>RVAHWWSPM</i> | <i>0,00</i> | <i>490</i> |
| 35 | YLATWWGML | 11,36 | 690 | | | | | |

Peptid 65 aus der Integrin-4 β D-Splice-Variante hat eine schwache, das entsprechende Mimotop (Peptid 66) mit Leucin in Position 9 aber eine deutlich stärkere stimulatorische Kapazität. Das natürliche und das modifizierte Epitop aus der *env*-Region HERV-K10 waren beide aktiv.

Der potentielle Antagonist Peptid 69 war tatsächlich negativ in Zytotoxizitätsassays, zeigte aber eine mittlere Aktivität bezüglich der IFN γ -Induktion. Die bei einer Reihe von Peptiden offenbare Segregation von Zytolyse und IFN γ -Ausschüttung läßt sich mit den Sequenzen dieser Peptide korrelieren. Für die Zytolyse war Arginin in Position 1 in Kombination mit Prolin in Position 8 oder Tyrosin in Position 1 in Kombination mit Methionin in Position 8 bevorzugt. Für IFN γ -Produktion hingegen war Tyrosin in Position 1 in Kombination mit Threonin und Prolin in Position 8 besonders aktiv. Threonin in Position 4 korrelierte positiv sowohl mit der Zytolyseaktivität als mit der IFN γ -Synthese.

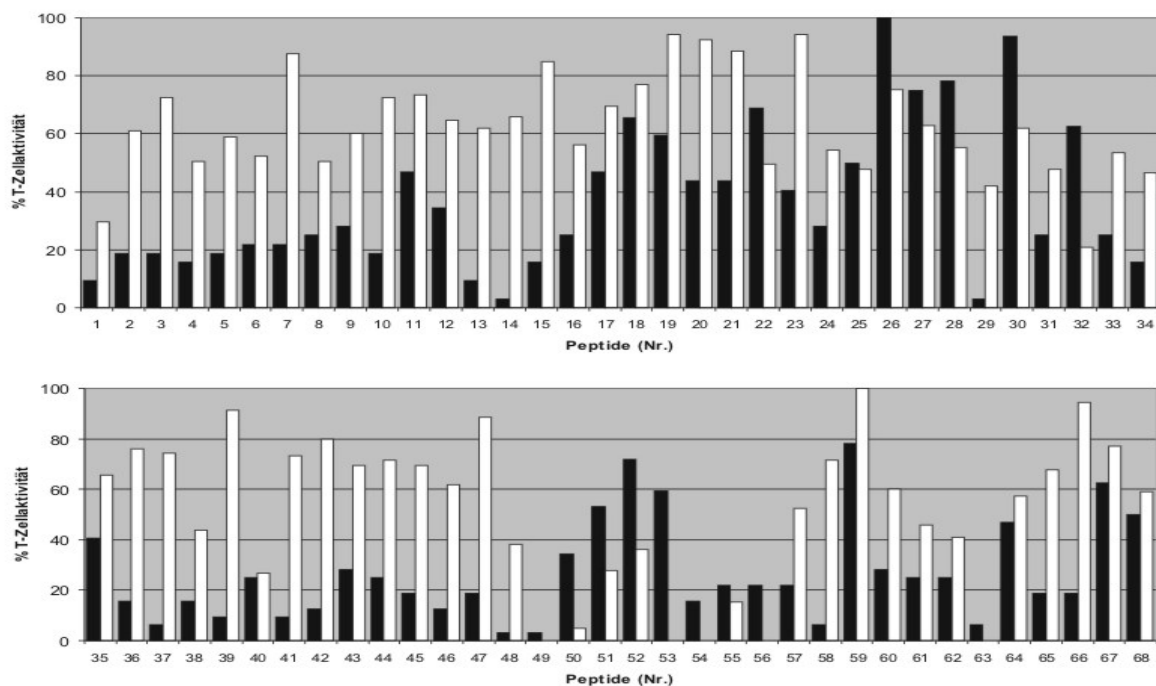


Abbildung 8: Vergleich der zytolytischen Aktivität (schwarze Säulen) und der IFN γ -Synthese (weisse Säulen) des Klon L1 auf die Mimotope und Epitope. Die Werte aus der **Tabelle 8** sind normalisiert, wobei die jeweiligen maximalen Werte in 100% gesetzt wurden. Die Peptide sind entsprechend der Numerierung in der Tabelle aufgelistet.

Die für die beiden Klone PN2 und L1 aktive Peptide weisen Sequenzähnlichkeit auf, was auf Übereinstimmung in den Spezifitätsrepertoire der Klone hindeuten könnte. Dies wurde in weiteren Untersuchungen geprüft. Der Klon PN2 war stabiler als Klon L1, sodass er auf Reaktivität auf L1-Peptide getestet werden konnte. Dazu wurden T2-Zellen mit L1-Peptiden (10 μ g/ml) gepulst und die spezifische Zytolyse durch PN2-T-Zellen anhand 51 Cr-Freisetzung gemessen. 14 der für L1 aktiven Epitope wurden auch von PN2 erkannt, wobei allerdings die Messwerte für 5 dieser Peptide relativ schwach waren. Peptide mit Tyrosin in Position 1 wurden vom Klon PN2 gar nicht erkannt, wie es auch aus den *Positional Scan*-Ergebnissen zu

erkennen war. Desweiteren wurde Threonin in Position 4 ebenfalls nicht erkannt. Die negativen Ergebnisse sind in **Tabelle 10** nicht dargestellt.

Tabelle 10: Das Reaktionsprofile des Klons PN2 auf L1-Peptide. Die Zytolyse wurde anhand der ^{51}Cr -Freisetzung gemessen und in % angegeben. Der ^{51}Cr -Freisetzungswert ohne Peptid war 1,75%.

| Nr. | Peptide | | | | | | | | | ^{51}Cr -Freisetzung (%) |
|-----|---------|---|----------|---|---|---|---|---|---|-----------------------------------|
| 1 | R | L | A | F | W | W | G | M | L | 35,62 |
| 2 | R | L | I | F | W | W | G | M | L | 9,53 |
| 29 | R | L | A | F | W | Y | S | P | L | 31,13 |
| 30 | R | L | I | F | W | Y | S | P | L | 7,93 |
| 9 | R | L | A | F | W | W | S | M | L | 29,08 |
| 10 | R | L | I | F | W | W | S | M | L | 11,96 |
| 25 | R | L | A | F | W | W | S | P | L | 26,75 |
| 26 | R | L | I | F | W | W | S | P | L | 10,86 |
| 13 | R | L | A | F | W | Y | S | M | L | 25,26 |
| 14 | R | L | I | F | W | Y | S | M | L | 5,47 |
| 5 | R | L | A | F | W | Y | G | M | L | 24,88 |
| 6 | R | L | I | F | W | Y | G | M | L | 3,08 |
| 17 | R | L | A | F | W | W | G | P | L | 19,01 |
| 18 | R | L | I | F | W | W | G | P | L | 3,02 |
| 21 | R | L | A | F | W | Y | G | P | L | 14,51 |
| 22 | R | L | I | F | W | Y | G | P | L | 4,60 |
| 69 | R | V | A | H | W | W | S | P | M | 17,34 |

Interessanterweise war zu beobachten, dass Alanin in Position 3 immer besser erkannt wurde als Isoleucin. Prolin in Position 8 hatte keinen Einfluss auf die T-Zellreaktion. Die Degeneriertheit der Erkennung von Aminosäuren in Position 8 war ebenfalls im *Positional Scan* zu beobachten (**Abb. 5**). Peptide mit Histidin in Position 4 hatten keinen Effekt bei der Stimulierung von Klon L1, wurden aber von Klon PN2 erkannt (**Tabelle 10**). Insgesamt lässt sich feststellen, dass trotz Ähnlichkeiten in manchen Sequenzen die beiden T-Zellklone L1 und PN2 unterschiedliche Spezifitäten haben und nur einzelne Peptide kreuzerkannt werden.

5.2 Funktionelle Avidität der Tumor-spezifischen T-Zellen

Obwohl eine große Anzahl von Peptiden von PN2-Zellen erkannt wurde, gibt es große Unterschiede in der Zahl der Spots im ELISpot-Assay, d.h. die T-Zellen sprechen je nach

Peptid unterschiedlich stark an. Diese Unterschiede können auf unterschiedliche Affinitäten der TCR von PN2 für die verschiedenen MHC-Peptidkomplexe und auf unterschiedliche Schwellenwerte in den individuellen T-Zellen für die Initiation einer Reaktion begründet sein. Unterschiedliche Schwellenwerte einzelner Zellen eines T-Zellklons wiederum können auf Unterschiede in der Dichte der TCR oder der kostimulatorischen Moleküle auf den Oberflächen der Zellen oder auf Expressionsunterschiede der Moleküle der Signaltransduktion oder der Transkriptionsfaktoren bzw. der Aktivierungszustände dieser Moleküle zurückzuführen zu sein. Diese verschiedenen Einflußgrößen können nicht im einzelnen quantitativ simultan zu der gemessenen Reaktion einer T-Zelle erfasst werden. Deswegen wird häufig die Potenz der Peptide, T-Zellen zu stimulieren, als sogenannte funktionelle Avidität (FA) bestimmt. Als FA wird die Konzentration an Antigen definiert, bei der die T-Zelle ihre halb-maximale Effektoraktivität wie z.B. Zytolyseaktivität erreicht. Für alle Peptide, auf die PN2 reagierte, wurde die FA in ^{51}Cr -Freisetzungsversuch bei einem Effektor zu Target (E/T) Ratio von 30:1 bestimmt. ^{51}Cr -Freisetzungsassays sind für diese Bestimmungen ausgewählt worden, da sie sensitiver als $\text{IFN}\gamma$ -Assays sind. Die Peptide wurden ab einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ seriell in $\sqrt{10}$ -Schritten titriert. Als Zielzellen wurden T2-Zellen 30 min mit den Peptiden beladen. Für die Auswertung der Daten wurden alle Konzentrationen in Molaritäten umgerechnet. **Abb. 9** zeigt einige repräsentative Beispiele für die Titrationsexperimente zur Bestimmung der FA von PN2 für die verschiedenen Peptide.

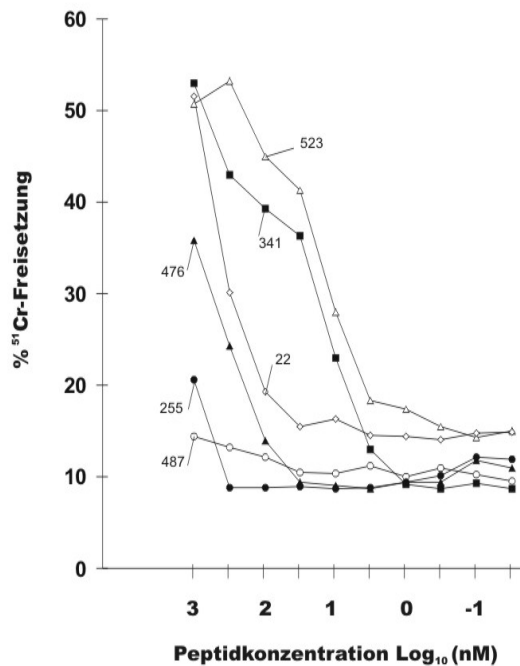


Abbildung 9: ^{51}Cr -Freisetzungsversuch zur Bestimmung der funktionellen Avidität. Die Peptidnummern mit entsprechenden Sequenzen sind im **Abb. 16** aufgelistet.

Peptid 258, dessen potentiell natürliches Ursprungprotein in den Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, wird schwächer erkannt als die Mimotope 351, 347, 352 und 341. Bei einer Peptidkonzentration von 100 pM wurde immer noch Zytolyse für die Mimotope beobachtet aber nicht für das natürliche Epitop. Zum Berechnen des halbmaximalen Zytolysewertes wurden die Titrationskurven nach Clark (Moyle et al., 1978) wie folgt linearisiert und graphisch dargestellt.

$$\log it(p) = \ln \frac{p}{(1-p)} \quad \text{mit} \quad p = \frac{(cpm_{\text{exp}} - cpm_{\text{bg}})}{(cpm_{\text{max}} - cpm_{\text{bg}})}$$

p = spezifische Zytolyse

Die linearisierten Regressionsgraden sind in **Abb. 10** dargestellt.

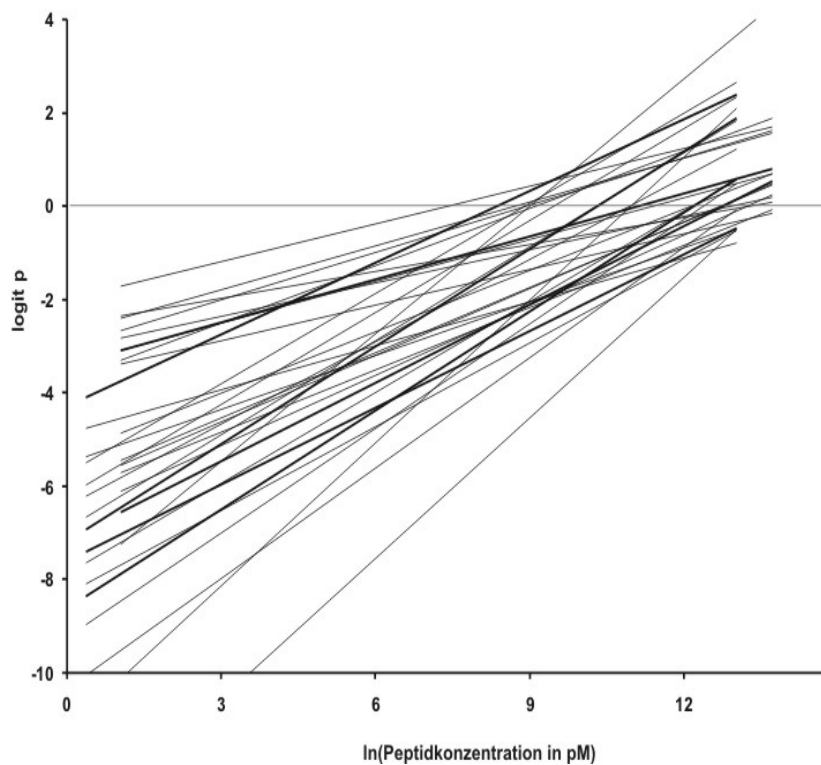


Abbildung 10: Die funktionelle Avidität von CTL-Klon PN2. Auf der X-Achse sind die Werte des natürlichen Logarithmus (ln) der Peptidkonzentration (pM), auf der Y-Achse die Werte für Logit (p) dargestellt. Für die linearisierten Titrationskurven wurden die Regressionsgraden berechnet und hier dargestellt.

Die horizontale Achse gibt die Werte für den natürlichen Logarithmus (ln) der Peptidkonzentration (pM) an, die vertikale Achse die Werte für Logit (p). Aus der Formel der Trendlinie für die einzelnen Titrationsen können die Konzentrationen berechnet werden, bei der Logit(p) gleich 0 ist. Diese einfach aus der linearen Gleichung ($y=ax-b$) ermittelte Werte für Logit (p)=0 entsprechen der für halbmaximale Zytolyse benötigten Peptidmengen, da Logit (p)=0 ist, wenn $p=0,5$ ist. In **Tabelle 11** sind die Peptidkonzentrationen für die halbmaximale Zytolysen in nanomolar (nM) angegeben. Je geringer diese Konzentrationen desto höher ist die FA. Für das Peptid mit der schwächsten FA (Peptid 57) wurde eine etwa 3×10^3 -fach höhere Peptidkonzentration für die halbmaximale Zytolyse benötigt als für das potenteste Peptid (Peptid 276). Die mRNA für das Ursprungprotein dieses Peptids wurde in den Tumorzellen des Patienten nachgewiesen. Die Mimotope 347, 341, 352 waren mit weniger als 10 nM Peptid für halbmaximale Zytolyse von vergleichbarer Avidität. Insgesamt schienen die Mimotope eher hohe FA aufzuweisen. Neben den für Klon PN2 bestimmten Peptide wurden zwei von PN2 kreuzerkannten L1-Peptide vermessen und erwiesen sich für PN2 als relativ schwach potent mit FA von 110 nM für Peptid 1 und mit 1170 nM für Peptid 5.

Tabelle 11: Die funktionelle Avidität des CTL-Klons PN2. Die Peptidmenge für halbmaximale Zytolyse wurde in nM angegeben. Die Mimotope sind in fett dargestellt. * markiert die L1-Peptide

| Nr | Sequenzen | nM | | Nr | Sequenzen | nM |
|------------|------------------|-----------------|--|------------|------------------|-----------------|
| 276 | KLRHWQQVL | 1,88E+00 | | 476 | KLAFWLLAV | 2,13E+02 |
| 347 | RLSFWQHKL | 6,74E+00 | | 520 | RLNWWVSV | 2,20E+02 |
| 341 | RLNWWQQKL | 8,10E+00 | | 350 | RLSNWNISL | 2,65E+02 |
| 352 | RLSWWQQKL | 8,46E+00 | | 339 | RLNFWQQKL | 3,68E+02 |
| 523 | RLRWWQPFV | 1,39E+01 | | 32 | RAKYWLERA | 3,87E+02 |
| 351 | RLSWWQHKL | 1,44E+01 | | 367 | RVSWWGSTL | 4,30E+02 |
| 482 | KLLYWNMAV | 3,21E+01 | | 258 | KISGWTQAL | 6,05E+02 |
| 25 | KVIFWSALA | 3,29E+01 | | 508 | RAVFWIEFV | 6,19E+02 |
| 47 | RLTFWTCLA | 3,32E+01 | | 6 | KADWWTNTA | 6,69E+02 |
| 262 | KLDYWSSQL | 4,66E+01 | | 254 | KILGWAWWL | 8,02E+02 |
| 348 | RLSFWQQKL | 4,96E+01 | | 255 | KINNWIVQL | 8,30E+02 |
| 340 | RLNWWQHKL | 7,67E+01 | | 5* | RLAFWYGML | 1,17E+03 |
| 22 | KLQFWAVTA | 9,34E+01 | | 16 | KLAGWHRIA | 1,19E+03 |
| 338 | RLNFWQHKL | 9,63E+01 | | 53 | RVKGWAPRA | 1,51E+03 |
| 1* | RLAFWWGML | 1,10E+02 | | 358 | RVAFWI IKL | 1,92E+03 |
| 124 | KALQVWSAI | 1,89E+02 | | 46 | RLLGWSLPA | 2,96E+03 |
| 126 | KAPHWTNRI | 1,96E+02 | | 57 | RVRAWQ RGA | 6,38E+03 |

Da Tumor-spezifische T-Zellen i.d.R. körpereigene Antigene erkennen, wird vielfach angenommen, dass ihre Aviditäten im Gegensatz zu den Aviditäten Virus-spezifischer T-Zellen für ihre Antigene gering seien. Um die Werte für die zuvor dargestellten FA des PN2-Klons für die verschiedenen Epitope und Mimotope einordnen und bewerten zu können, wurden die FA für die Cytomegalievirus-spezifische CTL-Linie CMV-IrM und für die Tumor-spezifische CTL-Linie ELA-Trit bestimmt (**Tabelle 12**). Die FA von CMV-IrM für ihr Epitope, das CMV-Peptid NLVPMVATV, wurde mit 133 nM bestimmt. Die FA der Tumor-spezifische Linie ELA-Trit für das ELA-Peptid (ELAGIGILTV) beträgt 100 pM. ELAGIGILTV ist ein Mimotop des natürlichen Epitopes EAAGIGILTV aus dem MART/Melan-A Protein, bei dem die MHC-Bindung durch einen Aminosäureaustausch in der ersten Ankerposition zu Leucine verbessert wurde. Die FA für das natürliche Peptid EAAGIGILTV war mit 4,7 nM deutlich niedriger als die für das Mimotop. Die FA der tumor-spezifische CTL war somit geringer als die FA der virus-spezifischen CTL-Linie. Der CTL-Klon ELA-Trit war aus einem Melanompatienten isoliert worden und lysiert autologe Tumorzelllinie, die MART/Melan-A expremieren (Trefzer et al., 2004), was bedeutet, dass eine FA von 4,7 nM ausreichend für eine tumorizide Aktivität der T-Zellen ist.

Die Effizienz der Antigenerkennung durch die tumor-spezifischen CTL ist, wie mehrfach gezeigt worden war, direkt mit der Effizienz ihrer Tumorerkennung korreliert (Dutoit et al., 2001, Gilboa 1999, Yee et al., 1999). Dutoit und Kollegen konnten zudem zeigen, dass die FA der T-Zellen mit der Stabilität der MHC-Peptid-Multimerbindung an die TCR korreliert (Dutoit et al., 2002), d.h. bei T-Zellen mit höherer FA ist die Bindung der MHC-Peptidkomplex-Multimere an die TCR stabiler und die Dissoziation der Multimere langsamer als bei den T-Zellen mit niedriger FA. Dies konnten wir auch bei unseren beiden CTL-Linien beobachten. Hierzu wurde die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) für die Dissoziation der löslichen tetrameren MHC-Peptidkomplexe von den T-Zellen anhand der Abnahme der MFI (engl. *mean fluorescence intensity*) der Fluorochrom-markierten MHC-Tetramerpeptidkomplexe ermittelt (diese Messungen wurde von Dr. Katrin Sparbier durchgeführt).

Tabelle 12: Die funktionelle Aviditäten der CTL-Linien CMV-IrM und ELA-Trit wurden mit Chromfreisetzungsversuchen, die Halbwertszeiten der Dissoziation der tetrameren MHC-Peptidkomplexe von den T-Zellen per Durchflußzytometrie bestimmt.

| Klon | Peptid | FA [nM] | $t_{1/2}$ [min] |
|----------|------------|---------|-----------------|
| CMV-IrM | NLVPMVATV | 133 | 5,5 |
| ELA-Trit | ELAGIGILTV | 0,1 | 46 |
| ELA-Trit | EAAGIGILTV | 4,7 | n.d. |

5.3 Charakterisierung der Tumorzellen und der Tumor-infiltrierenden T-Zellen

Die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen und Mimotopen für Patient WeW ermöglicht es zum ersten Mal Tumor-spezifische T-Zellen in den TIL-Populationen von CTCL spezifisch zu analysieren. Gleichzeitig kann, wie zuvor gezeigt, die Tumorzellen selbst anhand der Größe und TCR-V β 2-Expression erkannt werden. Mit diesen spezifischen Nachweisverfahren ist es jetzt möglich, die T-Zellen im Tumor differenziert zu analysieren. Hierzu wurden Multiparameteranalysen per Durchflusszytometrie mit den im Fall von Patient WeW ausreichenden Tumormaterial durchgeführt. Der Vorteil der durchflusszytometrischen Multiparameteranalyse ist die Möglichkeit für jede Zelle mehrere Parameter gleichzeitig zu untersuchen. Zur Definition unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen ist eine simultane Analyse von verschiedener Markermolekülen erforderlich. Außerdem ist es für die Charakterisierung rarer Tumor-spezifischer T-Zellen nötig, die Analyse auf der Einzelzellebene durchzuführen, was mit anderen Methoden wie z.B. PCR nicht möglich ist.

Der Nachweis spezifischer T-Zellen erfolgte mit Dimer X (BD), einer dimeren Form von HLA-A*0201 als Fusionsprotein mit Immunglobulin. Die Peptidbindungstasche der HLA-Anteile können mit synthetischen Peptiden beladen werden. Mit DimerX konnten Tumor-spezifische CTL direkt in Einzelzellsuspension des Tumors des Patienten WeW durchflusszytometrisch detektiert werden. Die Frequenzen lagen je nach Peptid zwischen 0,89% und 23,7% der CD3⁺CD8⁺-Zellen (siehe **Tabelle 13**).

Tabelle 13: Frequenzen von Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor von Patient WeW (Anteil an CD3⁺CD8⁺-T-Zellen in Prozent).

| Peptid | Sequenz | % der CD3 ⁺ CD8 ⁺ -T-Zellen |
|--------|-----------|---|
| 65 | YLVTWPATA | 1,95 |
| 276 | KLRHWQQVL | 0,89 |
| 341 | RLNWWQKQL | 9,47 |
| 347 | RLSFWQHKL | 3,47 |
| 351 | RLSWWQHKL | 4,9 |
| 358 | RVAFWIIKL | 23,70 |
| 367 | RVSWWGSTL | 6,23 |

Diese Peptide sind eine Auswahl der für die WeW-Tumor-spezifischen CTL-Klone L1 (Peptid 65) und PN2 (Peptide 276, 341, 347, 351, 358 und 367) bestimmten Epitope. Sie können im polyklonalen Gemisch der T-Zellen im Tumor, T-Zellklone mit anderen Feinspezifitäten als die der ursprünglichen Klone L1 und PN2 anzeigen. Die große Spannbreite der Frequenzen von T-Zellen mit Spezifitäten für die Peptide ist wahrscheinlich auf diese Unterschiede in den Feinspezifitäten der einzelnen T-Zellen zurückzuführen.

Für die weitergehende Analyse der T-Zellen wurden folgende Marker ausgewählt:

1. Marker für die Differenzierungszustände der Zellen. Hierzu gehören CD45RO, CD45RA, CCR7, CD27, CD28 und CD62L. CD45 ist eine membrangebundene Tyrosinphosphatase, die an der Signaltransduktion der T-Zellen beteiligt ist. Die schwere Isoform CD45RA wird auf naïven oder ruhenden T-Zellen exprimiert während die leichte Isoform CD45RO auf *memory* oder aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Barclay et al., 1993). Die Expression von CD45RA auf Effektorzellen wurde ebenfalls beschrieben. CCR7 ist ein Mitglied der *G-protein-coupled*-Chemokinrezeptorfamilie, das in der Adhesion und Chemotaxis der Zellen eine Rolle spielt und mit *homing* in die Lymphknoten korreliert ist (Hasegawa, et al., 2000). CD28 wirkt nach

Bindung an CD80 und CD86 kostimulatorisch auf die Proliferation der T-Zellen (Schlossman et al., 1995). CD27 hat anscheinend auch eine kostimulatorische Funktion für T- und B-Zellen (Hintzen, et al., 1994). Der molekulare Mechanismus der Kostimulation ist aber noch nicht aufgeklärt. CD70 ist einer der nachgewiesenen Gegenrezeptoren für CD27 (Bowman, et al., 1994). Die CD27/CD70 Interaktion spielt eine Rolle bei der direkten Kommunikation zwischen T-Zellen. CD62L ist ein Homingrezeptor der L-Selektinfamilie in peripheren lymphoiden Geweben. Verschiedene T-Zellsubpopulationen exprimieren unterschiedliche Kombinationen dieser Marker: CCR7⁺CD45RO⁺ Zellen wurden als *effector memory* und CCR7⁺CD45RO⁺-Zellen als *central memory T-Zellen* bezeichnet (Sallusto, et al., 1999). Bei einer alternativen Definition werden als *effector memory* T-Zellen CD45RA⁺CD62L⁻-Zellen und als *central memory* T-Zellen CD45RA⁻CD62L⁺-Zellen bezeichnet (Maldonado, et al., 2003).

2. Marker für den Aktivierungszustand der T-Zellen: HLA-DR, CD25, CD26, CD69, CD30, CD38 und CD71. CD69 ist ein Kurzzeitaktivierungsmarker, d.h. es wird sehr schnell hochreguliert bleibt aber nur für wenige Stunden exprimiert, und HLA-DR ein Langzeitaktivierungsmarker, d.h. nach Induktion bleibt dieser Marker für Tage auf der Zelloberfläche (Knapp et al., 1989; Schlossman et al., 1995). CD30 ist auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert. Die molekularen Effekte dieser Marker auf die T-Zelle sind nicht klar. CD25 ist eine Untereinheit des hochaffinen IL-2 Rezeptors und wird auf proliferierenden T-Zellen exprimiert (Knapp et al., 1989; Schlossman et al., 1995). Die Exopeptidase CD26 ist als kostimulatorisches Molekül bei der T-Zellaktivierung beschrieben worden (Fleischer, 1994). CD71 ist der Transferinrezeptor und wird auf allen sich teilenden Zellen exprimiert (Schlossman et al., 1995). Für CD38 ist die Funktion unklar. Möglicherweise ist es an der Regulation der Zellaktivierung und Proliferation über Modulatoren des Ca²⁺-Transports beteiligt.

3. Marker für Effektorfunktion der T-Zellen: Fas/FasL, Granzym und Perforin. Für die antigen-abhängige Zytotoxizität benötigt die zytotoxische T-Zelle Perforin und Granzym. Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle und bildet dabei Poren. Granzyme sind Serinesterasen, die Apoptose auslösen. Durch Fas und FasL Wechselwirkung wird dagegen antigen-unabhängige Zytotoxizität ausgelöst. Fas induziert nach Bindung an FasL Apoptose der Zellen durch Aktivierung von Caspasen (Ju, et al., 1995).

4. Marker für NK-Zellen und NK-ähnliche Eigenschaften von T-Zellen: CD56, KIR NKAT2, und KIR NKB1. CD56 ist ein NK-Zellmarker, kommt aber auch auf normalen T-Zellen vor. Es ist ein membrangebundens Gycoprotein, das auch NCAM (engl. *neural cell adhesion*

molecule) genannt wird und an der Zell-Zelladhesion beteiligt ist (Schlossman et al., 1995).

KIRs (engl. *killing inhibitory receptors*) sind auf NK-Zellen und manchen T-Zellen exprimiert und blockieren zytotoxische Aktivität nach Bindung an bestimmten HLA-Molekülen. KIR mit langem zytoplasmatischen Teil inhibieren während KIR mit kurzem zytoplasmatischen Teil die T- und NK-Zellaktivität induzieren können (Parham, 2000).

5. Marker für Suppressor T-Zellen: GITR, CTLA-4 und PD1. Durch die Bindung an CD80/CD86 reguliert CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4*) die T-Zellen negativ (Walunas, et al., 1994). GITR (engl. *glucocorticoid induced TNF receptor family related gene*) ist ein neues Mitglied der TNFR-Familie, das wahrscheinlich an der Regulation der TCR-vermittelten Apoptose beteiligt ist (Nocentini, et al., 1997). Mitglieder der TNFR-Familien (eng. *Tumor necrosis factor receptor*) sind Todesrezeptoren (engl. *death receptors*) auf der Zelloberfläche, die durch Bindung an spezifischen Liganden Apoptose in den Zellen auslösen. PD-1 wird auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert und inhibiert die Aktivierung der Zellen (Freeman, et al., 2000).

Tabelle 14 zeigt die Expression dieser Markermoleküle durch T-Zellen, die aus dem Tumor des Patienten WeW direkt isoliert wurden. Tumorzellen bei CTCL sind in der Regel reife $CD4^+$ -T-Zellen mit $CD45RO^+$ -Phänotyp (Sterny and Mielke, 1989). Bei dem Patient WeW exprimierten fast alle TCR $V\beta 2^+$ -Tumorzellen $CD45RO$, nicht $CD45RA$. Die $CD8^+$ -T-Zellen waren überwiegend $CD45RO^+CCR7^-$, wobei diese per Definition zu den *effector memory* T-Zellen gehören (Sallusto, et al., 1999). Obwohl der Großteil von $CD8^+$ -T-Zellen wie terminal differenzierte Effektorzellen erschien, war die Expression des Langzeitaktivierungsmarkers HLA-DR und des Kurzzeitaktivierungsmarkers CD69 nur bei einem kleinen Teil dieser Zellen zu beobachten. Der Transferrinrezeptor CD71 war im starken Maße von den Tumorzellen aber nicht von den $CD8^+$ -T-Zellen exprimiert. Ausserdem exprimierten die Tumorzellen CCR7. CD27 wurde von den meisten Tumorzellen und $CD8^+$ -T-Zellen gleichermaßen exprimiert.

Tabelle 14: Durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellen, d.h. große TCR-V β 2⁺-Zellen, und CD8⁺-T-Zellen im Tumor des Patienten WeW. Für die einzelnen Marker ist jeweils, der prozentuale Anteil an positiven Zellen wie folgt angezeigt: +++++ 80-100% positive Zellen; ++++ 60-80% positive Zellen; +++ 40-60% positive Zellen; ++ 20-40%; + unter 20% positive Zellen; - keine positive Zellen

| | TCR V β 2 ⁺ | CD8 ⁺ -TIL |
|------------|------------------------------|-----------------------|
| CD25 | - | - |
| CD26 | + | + |
| CD27 | +++++ | +++++ |
| CD28 | +++ | + |
| CD30 | - | - |
| CD38 | | + |
| CD45RA | - | + |
| CD45RO | +++++ | +++++ |
| CD56 | - | + |
| CD62L | - | + |
| CD69 | - | + |
| CD71 | +++++ | - |
| CCR7 | +++++ | - |
| CTLA-4 | - | + |
| Fas (CD95) | - | +++++ |
| FasL | +++++ | ++ |
| GITR | + | + |
| Granzym B | - | + |
| HLA-DR | - | + |
| KIR NKAT2 | - | - |
| KIR NKB1 | | |
| PD1 | - | - |
| Perforin | - | - |

Die Tumorzellen wie auch Tumor-infiltrierenden CD8⁺-T-Zellen exprimierten FasL, wogegen die normalen T-Zellen, darunter die CD8⁺-T-Zellen, aber nicht die Tumorzellen den entsprechenden Rezeptor Fas (CD95) exprimierten. Die Dotblots der durchflußzytometrischen Analyse der Zellen aus dem Tumor zeigen diese Expression von Fas auf den Tumor-infiltrierenden T-Zellen und FasL auf den V β 2-positiven Tumorzellen wie auch V β 2-negativen T-Zellen (**Abb. 11**). Dies kann auf „*tumor-counterattack*“ gegen die Tumorspezifische Immunantwort hindeuten, wie es auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Ni, et al., 2001; Whiteside and Rabinowich, 1998; Zoi-Toli, et al., 2000). Nur ein kleiner Teil der CD8⁺-T-Zellen tragen die zytotoxischen Effektormoleküle Perforin und Granzym. Sie können also nur zu einem geringen Teil zytotoxische Funktion ausüben. Dies gilt für beide

Mechanismen der Zytotoxizität. Die Tumorzellen allerdings könnten durchaus Apoptose in den $CD8^+$ -T-Zellen auslösen.

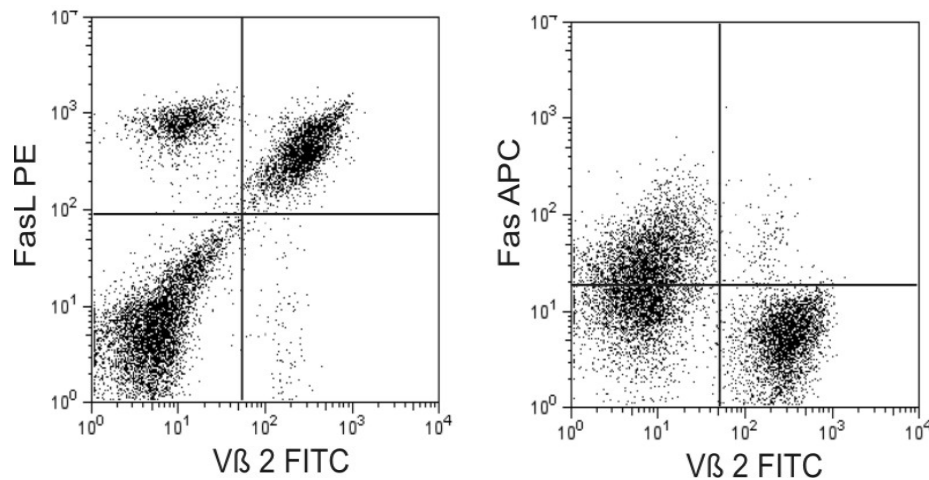


Abbildung 11: Expression von FasL bei den Tumorzellen und Vβ2-negativen T-Zellen sowie von Fas-Rezeptor bei Nicht-Tumorzellen vom Patient WeW

Das zuvor beschriebenes Expressionsprofil der Tumor-infiltrierenden $CD8^+$ -T-Zellen wurde mit den DimerX, die mit Tumor-assoziierten T-Zellepitopen beladen waren, für Tumor-spezifische T-Zellen bestätigt (**Tabelle 15**). Die Tumor-spezifischen T-Zellen exprimierten überwiegend CD45RO aber nicht CD45RA und waren zum größten Teil CD62L-negativ. Demzufolge sind sie weder *central memory* noch *effector memory* T-Zellen, wie sie von Maldonado und Kollegen definiert wurden (Maldonado, et al., 2003). Zudem wurden bestätigt, dass die Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor nicht zytotoxisch sind.

Tabelle 15: Phänotyp der Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor: Die Zellen wurden mit DimerX (65, 367, 347, 351, 276, 341, 358) markiert. Für die einzelnen Marker ist jeweils, der prozentuale Anteil an positiven Zellen wie gefolgt angezeigt: +++++ 80-100% positive Zellen; ++++ 60-80% positive Zellen; +++ 40-60% positive Zellen; ++ 20-40% positive Zellen; + unter 20% positive Zellen; - keine positive Zellen

| Antigen | T-Zellen (DimerX ⁺) |
|----------|---------------------------------|
| CCR7 | - |
| CD25 | - |
| CD45RA | + |
| CD45RO | +++++ |
| CD56 | + |
| CD62L | + |
| CD71 | - |
| GranzymB | + |
| Perforin | - |

Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zu dem, was in gesunden Probanden zu sehen ist (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen der Effektormoleküle deutet auf eine gestörte Funktion von Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor hin. Trotzdem wurde eine schwache Expression von CD69 und HLA-DR auf einigen CD8⁺-T-Zellen gefunden, was darauf hindeutet, daß nicht alle T-Zellen defekt sind. Keine der Antigen-spezifischen T-Zellen exprimierten CD71, d.h. die Zellen proliferieren nicht. Insgesamt ergibt sich der Eindruck, dass die Tumor-spezifischen T-Zellen anerg sind.

Einige frühere Veröffentlichungen berichteten von einer Expression von IL-10 in den Läsionen bei kutanen Lymphomen (Asadullah, et al., 1996). Die Expression nimmt mit Tumorstadien zu, so daß geschlossen wurde, daß die Tumorzellen diese immunsuppressive Zytokine sezernieren und so die Tumor-spezifische T-Zellen unterdrückt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Frage aufgegriffen und die Expression von IL-10 in gereinigten Tumorzellen untersucht. Es wurde keine IL-10-Expression gefunden (**Abb. 12**). Hingegen wurde eine Expression von TGF- β in den Tumorzellen nachgewiesen. TGF- β wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert und hat immunsuppressive Funktionen. Die Suppression von Synthese der Zytokine wie TNF- α und IFN- γ wurde in der Literatur berichtet (Fischer, et al., 1995). Die Expressionsanalysen dieser beiden Zytokine wurde mittels RT-PCR mit Primern der entsprechenden Spezifitäten durchgeführt. Als positive Kontrolle für den IL-10-Nachweis wurde PBMC aus gesundem Spender für 24h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert.

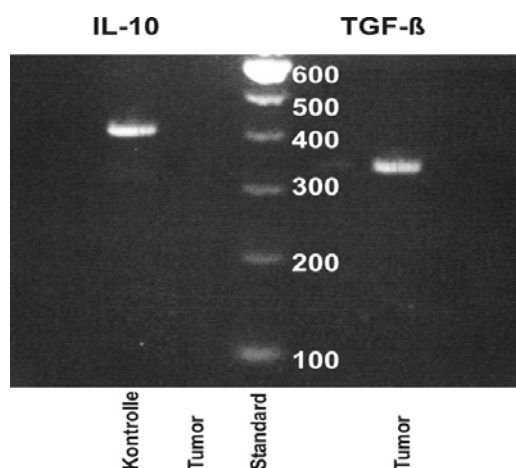


Abbildung 12: Expression von TGF- β aber nicht von IL-10 durch die Tumorzellen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse einer RT-PCR-Analyse auf die mRNA für die Zytokine

Neben den immunsuppressiven Effekten, die direkt von den Tumorzellen ausgehen, wurde postuliert, dass suppressor T-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) dazu beitragen, die Tumor-spezifische Immunantwort zu unterdrücken. Diesen regulatorischen T-Zellen wird eine Funktion bei der Erhaltung der Autotoleranz zugeordnet. Die der negativen Selektion im Thymus entgangenen, selbst-reaktiven T-Zellen müssen vom Immunsystem in der Peripherie kontrolliert werden, um mögliche Autoimmunreaktionen zu vermeiden. Die Interaktion der inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 mit den entsprechenden Gegenrezeptoren der B7-Familie wird als möglicher Mechanismus für die negative Regulation der T-Zellaktivierung beschrieben (Carreno and Collins, 2002). Eine erhöhte Expression von GITR wurde bei $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen beobachtet, wobei deren regulatorische Funktion durch agonistische anti-GITR Antikörper aufgehoben werden kann (McHugh, et al., 2002; Shimizu, et al., 2002). Die oben beschriebenen potentiellen Tumor-assoziierten Antigene beim Patient WeW sind Selbstantigene und unterliegen damit der Autotoleranzregulation. Die Untersuchung der Tumor-infiltrierenden T-Zellen beim Patienten WeW ergab keinen Hinweis auf klassische $CD4^+CD25^+GITR^+$ -T-Zellen. Allerdings wurde eine Population von vorwiegend $CD3^+CD8^+GITR^+$ und CTLA-4 positiven T-Zellen gefunden (**Abb. 13**). Diese Zellen wiesen eine intermediäre TCR-Expression auf. Ob sie tatsächlich eine immunsuppressive Funktion ausüben muss weiter untersucht werden. Die geringe Zellzahlen bei kutanen Lymphomen beschränken allerdings die Möglichkeiten für solche Untersuchungen.

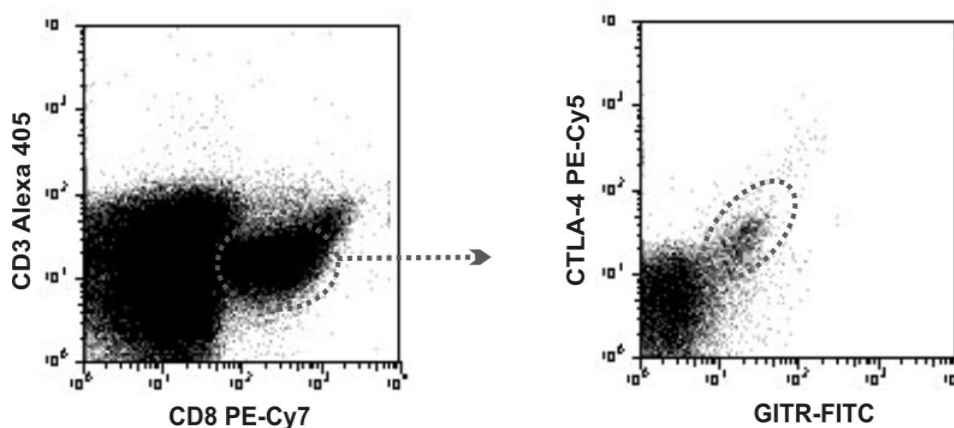


Abbildung 13: $CD8^+$ Subpopulation mit Expression von GITR und CTLA-4 im Tumor. Auf dem rechten Bild sind nur $CD8^+$ -T-Zellen angezeigt.

Insgesamt zeigen diese Analysen, dass die Tumor-spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen anerg sind, einen ungewöhnlichen Phänotyp aufweisen und ihnen die zytotoxischen Effektormoleküle

fehlten. Die Tumorzellen sind dagegen FasL-positiv und damit gefährlich für die Fas-positiven T-Zellen. Konventionelle Suppressor-T-Zellen waren im Tumor nicht nachweisbar. Die Rolle der ungewöhnlichen $CD3^+CD8^+CTLA-4^+GITR^+$ -T-Zellen bleibt ungeklärt.

5.4 Repertoire der Tumor-spezifischen T-Zellen

Frühere Arbeiten mit murinen T-Zellklonen haben gezeigt, dass verschiedene Peptide, die von denselben T-Zellklonen erkannt werden, ihrerseits unterschiedliche Repertoires an T-Zellen ansprechen (Gundlach, et al., 1996). Diese Veröffentlichung stimmt mit Beobachtungen für humane Tumor-spezifische T-Zellen überein, die in Zusammenhang mit vakzinationstherapeutischen Eingriffen bei Melanompatienten durchgeführt wurden. Bei der Untersuchung der Frequenzen von $CD8^+$ -T-Zellen mit Spezifität für das MART/Melan-A-Epitop AAGIGILTV bzw. eines Mimotops dieses Epitops, ELAGIGILTV, zeigte sich, dass nach *ex vivo* Stimulation mit dem Mimotop mehr T-Zellen $IFN\gamma$ produzieren als mit dem natürlichen Epitop (Trefzer et al., 2004). Diese Beobachtung zeigt, dass mit den Mimotopen andere oder mehr T-Zellen angesprochen werden können als mit den natürlichen Epitopen. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, mit dem natürlichen Epitop *in vivo* geprimten T-Zellen, d.h. durch die Tumorzellen möglicherweise auch anerg gewordene T-Zellen, durch Mimotope effektiver stimulieren zu können. ELISpot-Analysen mit PBMC des Patienten WeW nach der Stimulation mit den Epitopen und Mimotopen, die für Klon L1 (**Abb. 14**) bzw. für Klon PN2 (**Abb. 15**) definiert wurden, zeigen, dass nahezu alle Peptide auch hier aktiv sind, also die korrespondierenden T-Zellen auch im peripheren Blut zirkulieren und die Spezifitäten der beiden Klone L1 und PN2 repräsentativ für die Spezifitäten dieser zirkulierenden T-Zellen sind. Gleichzeitig ist deutlich, dass die Peptide sich sehr stark darin unterscheiden, wieviele T-Zellen jeweils stimuliert werden können. Ein Vergleich des Spezifitätsprofils mit den Spezifitätsprofilen, die für die Klone L1 (**Abb. 14**) und PN2 (**Abb. 15**) bestimmt wurden, läßt die Unterschiede deutlich werden.

Es gibt eine Reihe von Peptiden, die effektiv die Klone stimulieren aber nicht die T-Zellen aus PBMC und umgekehrt. Peptide 55, 31, 60, 7, 36, 39, und 47 sind Beispiele für den ersten, Peptide 26, 53, 52, 67 und 68 Beispiele für den zweiten Fall. Der PBMC-T-Zellpool enthält also T-Zellen, welche die für die Klone L1 und PN2 definierten Epitope und Mimotope mit anderen Präferenzen erkennen, also unterschiedliche Feinspezifitäten aufweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es möglich ist, durch Kombination der unterschiedlichen

Peptide, die die gleiche T-Zellspezifität repräsentieren, ein erweitertes T-Zellrepertoire anzusprechen.

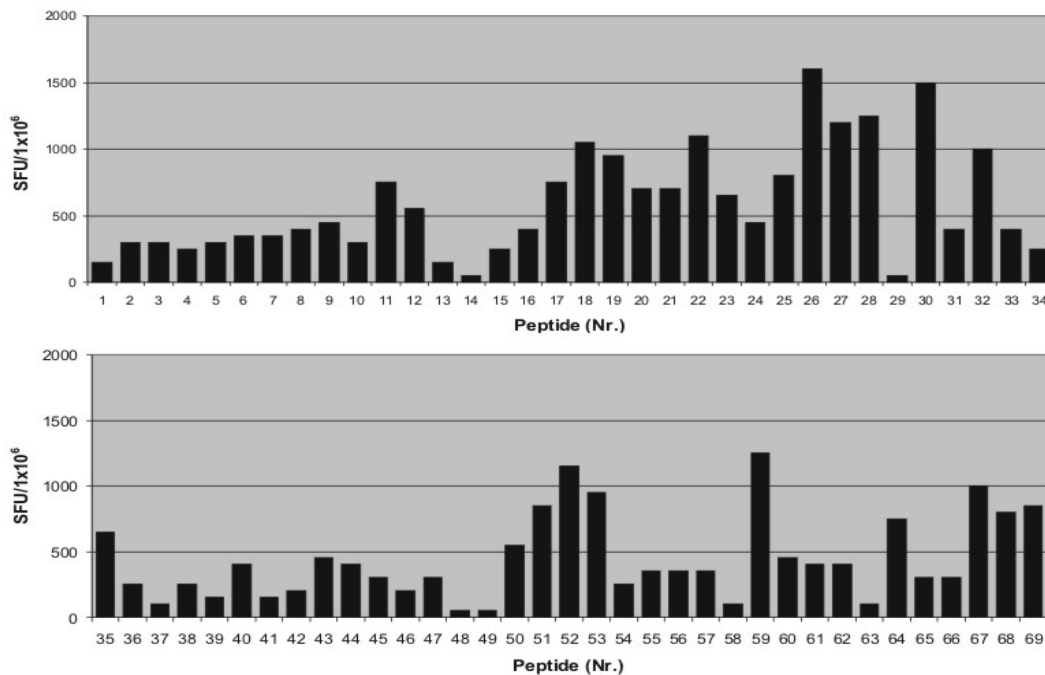


Abbildung 14: Repertoireanalyse der L1-peptidspezifischen T-Zellen im peripheren Blut des Patienten WeW per ELISpot. In der vertikalen Achse ist SFU pro 1x10⁶ CD8⁺-T-Zellen angezeigt. Die Peptidsequenzen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Da zum Nachweis der Tumor-spezifischen T-Zellen in peripheren Bluten ein ELISpot-Assay auf IFN γ verwendet wurde, sind die so nachgewiesenen T-Zellen nicht anerg. Die Kombination verschiedener Peptide zur Stimulation eines T-Zellpools gegen den Tumor könnte damit helfen, das Problem zu umgehen, dass ein Teil der Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor anerg ist, d.h. Mimotope könnten es möglich machen, einen aktiven T-Zellpool für die Bekämpfung des Tumors zu rekrutieren.

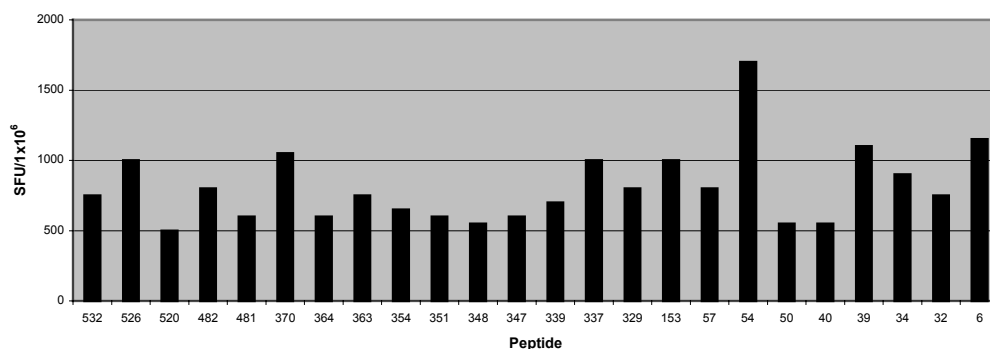


Abbildung 15: Repertoireanalyse der PN2-Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut des Patienten WeW per ELISpot. In der vertikalen Achse ist SFU pro 1x10⁶ CD8⁺-T-Zellen angezeigt. Peptidsequenzen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Um die Spezifität Mimotop-induzierter T-Zellen weiter zu untersuchen, wurden mit den Mimotopen Peptide Nr. 347 und 352 sowie den potentiellen natürlichen Epitope Peptide Nr. 22, 258, 276 PBMC aus zwei HLA-A*0201 positiven gesunden Spender *in vitro* induziert. Dazu wurden CD8⁺-T-Zellen aus PBMC positiv magnetisch isoliert und die CD8⁻-Fraktion mit 10 µg/ml Peptid inkubiert, bestrahlt und den CD8⁺-T-Zellen als Stimulatorzellen zugemischt. Die Zellen wurden nach 10 bis 14 Tage restimuliert und nach jeder Stimulation in ELISpot-Assays getestet. Bei den Peptiden Nr. 22, 258 und 276 konnte nach zwei Stimulationen keine spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den Mimotopen Nr. 347 und 352 spezifische T-Zelllinien etabliert werden. Die PBMC waren vorher in ELISpot-assays mit negativen Ergebnissen auf die Peptide Nr. 22, 258, 276, 338, 339, 340, 341, 347, 348, 351 und 352 getestet worden. In diesen Induktionsversuchen konnte also nur mit Mimotopen eine spezifische T-Zellreaktion induziert werden. Für den Vergleich der Spezifitätsrepertoire der T-Zelllinien wurden diese bei einer E/T-Ratio von 20:1 in Chromfreisetzungsversuchen getestet. Dabei wurde T2-Zelllinie mit je 10µg/ml Peptid beladen und als Zielzellen eingesetzt. **Abb. 16** zeigt die normalisierten Werte der spezifischen Chromfreisetzungswerte für die einzelnen Peptide. Die mit den Peptiden 347 und 352 induzierten T-Zelllinien erkennen auch alle anderen Mimotope (Peptide Nr. 338, 339, 340, 341, 348 und 351). Die potentiellen natürlichen Epitope 22, 258 und 276 wurden von T-Zelllinie aus Spender A erkannt aber nicht von der Linie aus Spender B. Insgesamt sind sich die Spezifitätsprofile der beiden mit unterschiedlichen Mimotopen induzierten T-Zelllinien aus Spender A sehr ähnlich, während die T-Zelllinien aus Spender B deutlich davon abweicht. Das Profil des Klons PN2 ist gegenüber den Profilen der T-Zelllinien des Spenders A sehr eingeschränkt aber vollständig von den Profilen der Mimotop-induzierten Linien abgedeckt. Insgesamt erwiesen sich die Mimotope in diesen Versuchen als potente Induktoren von T-Zellreaktionen mit breiten Spezifitätsprofilen.

Experimente und Ergebnisse

| Nr | Sequenz | 1 | 2 | 3 | 4 | Nr | Sequenz | 1 | 2 | 3 | 4 | Nr | Sequenz | 1 | 2 | 3 | 4 | Nr | Sequenz | 1 | 2 | 3 | 4 | Nr | Sequenz | 1 | 2 | 3 | 4 | |
|-----|-------------|----|----|----|----|-----|--------------|----|----|----|----|-----|--------------|----|----|----|----|-----|--------------|----|----|----|---|-----|--------------|---------------|----|---|---|---|
| 337 | RLYYNRL | 91 | 99 | 81 | 85 | 459 | KAQWIAIADV | 6 | 14 | 64 | 1 | 317 | RAPIWPTL | 21 | 45 | 0 | 34 | 463 | KAVGAGATV | 8 | 61 | 0 | 0 | 10 | KALFVAVAVA | 16 | 6 | 0 | 0 | |
| 348 | RLSEWQOKL | 99 | 80 | 65 | 77 | 57 | RVPARQORGA | 24 | 34 | 3 | 17 | 145 | RAHWSAIIT | 16 | 12 | 72 | 0 | 30 | RAACHHLVA | 34 | 32 | 0 | 0 | 502 | RAFPWGLRV | 18 | 3 | 0 | 0 | |
| 352 | RLSMWQOKL | 55 | 93 | 71 | 78 | 368 | RVINNRRL | 69 | 65 | 0 | 71 | 267 | KLKFTVYDL | 15 | 18 | 66 | 0 | 124 | KALQVNSAI | 6 | 0 | 59 | 0 | 275 | KLQWMSRL | 12 | 10 | 0 | 0 | |
| 339 | RLNEWQOKL | 61 | 69 | 84 | 77 | 360 | RVCDWHSDL | 49 | 73 | 0 | 76 | 321 | RASAMMLK | 16 | 38 | 0 | 44 | 290 | KYMACTLAL | 2 | 63 | 0 | 0 | 252 | KAVGWCSEL | 14 | 7 | 0 | 0 | |
| 367 | RVSWMGSJTL | 54 | 82 | 65 | 88 | 365 | RVGWMSJTL | 37 | 72 | 0 | 83 | 129 | KISWMTAI | 18 | 49 | 31 | 0 | 322 | RAMACTELL | 15 | 50 | 0 | 0 | 369 | RYVGWGPVL | 10 | 11 | 0 | 0 | |
| 338 | RLNEWQOKL | 81 | 71 | 74 | 64 | 344 | RLDWMRSJL | 50 | 72 | 0 | 59 | 47 | RLTWTQAL | 16 | 36 | 46 | 0 | 12 | KICAMQOLA | 0 | 5 | 59 | 0 | 273 | KLDPMLPQL | 13 | 8 | 0 | 0 | |
| 341 | RLNMWQOKL | 62 | 83 | 70 | 73 | 371 | RVAWAPVTL | 37 | 43 | 0 | 99 | 269 | KLHWLSJL | 13 | 4 | 80 | 0 | 25 | KIIFPSALA | 13 | 0 | 51 | 0 | 20 | KLIDWLEDA | 15 | 6 | 0 | 0 | |
| 340 | RLNMWQOKL | 56 | 80 | 74 | 77 | 332 | RLKFWLVL | 28 | 55 | 0 | 86 | 469 | KISAMHNV | 9 | 6 | 82 | 0 | 35 | RAQWARGDA | 18 | 42 | 0 | 0 | 125 | KANDWQFI | 16 | 2 | 0 | 0 | |
| 346 | RLRHVYJTL | 48 | 56 | 88 | 94 | 342 | RLPAMALV | 31 | 73 | 0 | 56 | 490 | RADWMPAV | 3 | 21 | 73 | 0 | 508 | RAVFEIEFV | 8 | 47 | 0 | 0 | 11 | KAQWLFDA | 13 | 5 | 0 | 0 | |
| 351 | RLSMWQOKL | 69 | 85 | 75 | 48 | 324 | RLIPWIOQL | 28 | 31 | 0 | 97 | 319 | RAQWMEAL | 15 | 55 | 0 | 27 | 270 | KIMANFFL | 8 | 47 | 0 | 0 | 131 | KLIPWQKI | 13 | 5 | 0 | 0 | |
| 347 | RLSEWQOKL | 81 | 54 | 72 | 68 | 330 | RLCPWGTJL | 26 | 35 | 0 | 94 | 529 | RYLWNSIGV | 24 | 59 | 0 | 14 | 36 | RARAWLRLA | 20 | 34 | 0 | 0 | 123 | KALEWNSAI | 10 | 7 | 0 | 0 | |
| 526 | RVCYWTLIRV | 45 | 69 | 99 | 56 | 320 | RAQFWALL | 41 | 34 | 0 | 80 | 522 | RLRARGARV | 21 | 38 | 33 | 0 | 4 | KAADWLFSA | 42 | 11 | 0 | 0 | 268 | KLICWCTL | 13 | 4 | 0 | 0 | |
| 532 | RLVYIPIVY | 41 | 67 | 80 | 78 | 316 | RAPAWJLRL | 41 | 65 | 0 | 50 | 504 | RAQFWSAYV | 7 | 61 | 24 | 0 | 148 | RAMWNSJ | 14 | 37 | 0 | 0 | 121 | KALEWJALI | 10 | 6 | 0 | 0 | |
| 534 | RVSHWMLGV | 28 | 61 | 87 | 83 | 482 | KLPMWQMEV | 42 | 51 | 61 | 0 | 51 | RLMTWPELA | 37 | 26 | 0 | 22 | 247 | KAMPWALS | 12 | 38 | 0 | 0 | 255 | KINNWIVOL | 10 | 6 | 0 | 0 | |
| 356 | RLYYWJGL | 35 | 37 | 90 | 93 | 312 | RALDWTEKL | 51 | 37 | 0 | 67 | 327 | RIPEWQDL | 13 | 43 | 0 | 28 | 530 | RYLCWJLVV | 3 | 47 | 0 | 0 | 8 | KAKASHMA | 10 | 5 | 0 | 0 | |
| 363 | RVLFGRJTL | 70 | 55 | 34 | 83 | 362 | RVDWVPEWL | 28 | 58 | 0 | 64 | 33 | RAKWYVERA | 18 | 31 | 35 | 0 | 517 | RLLEMLPDV | 16 | 31 | 0 | 0 | 256 | KISDWAKL | 6 | 9 | 0 | 0 | |
| 354 | RLVYWLJTL | 42 | 48 | 51 | 93 | 333 | RLVWWSCTL | 19 | 53 | 0 | 76 | 313 | RALEWJLWL | 19 | 60 | 0 | 5 | 281 | KJMEWJGL | 42 | 5 | 0 | 0 | 263 | KLKDWJENL | 12 | 3 | 0 | 0 | |
| 358 | RYAFWJIKL | 38 | 66 | 46 | 81 | 343 | RLPAMQJTL | 29 | 56 | 0 | 61 | 291 | KVARGJGL | 20 | 31 | 0 | 31 | 506 | RAWDJQDV | 8 | 38 | 0 | 0 | 471 | KITPWSKV | 11 | 3 | 0 | 0 | |
| 531 | RLPWOQJY | 49 | 42 | 47 | 90 | 262 | KLDPWSSOL | 19 | 57 | 70 | 0 | 288 | KVINWQJSL | 10 | 15 | 54 | 0 | 146 | RAQWMSRDI | 12 | 33 | 0 | 0 | 14 | KIPWJLYLA | 12 | 1 | 0 | 0 | |
| 370 | RVFPMWJTL | 44 | 49 | 63 | 71 | 524 | RLTPWIVAV | 26 | 40 | 0 | 76 | 258 | KISWQJAL | 10 | 15 | 52 | 0 | 134 | KJMEWJCI | 37 | 6 | 0 | 0 | 138 | KVLEWJAST | 11 | 2 | 0 | 0 | |
| 521 | RLQWNVYV | 56 | 57 | 26 | 81 | 336 | RLAWJLWJL | 20 | 52 | 0 | 68 | 279 | RLSWMESL | 16 | 49 | 11 | 0 | 259 | KLAWIOJL | 13 | 29 | 0 | 0 | 122 | KALEWJARI | 10 | 2 | 0 | 0 | |
| 523 | RLRWQJPV | 21 | 63 | 92 | 40 | 334 | RLAWJLJTL | 27 | 46 | 0 | 67 | 38 | RAQWMAAA | 28 | 27 | 0 | 18 | 42 | RIPEWLFVA | 17 | 24 | 0 | 0 | 483 | KLPPWNPQV | 5 | 7 | 0 | 0 | |
| 349 | RLSHGRJTL | 53 | 54 | 27 | 81 | 56 | RVNAWQAKA | 52 | 25 | 59 | 0 | 150 | RLCWGJPII | 20 | 42 | 0 | 7 | 156 | RNEWJEIF | 14 | 27 | 0 | 0 | 149 | RIYDWJQRI | 9 | 3 | 0 | 0 | |
| 519 | RLNMWJTV | 5 | 58 | 82 | 68 | 315 | RAPAWJAGL | 14 | 81 | 0 | 39 | 27 | KVKWCSGGA | 22 | 23 | 0 | 19 | 21 | KLJGTHCA | 15 | 0 | 26 | 0 | 468 | KJGWQJAEV | 9 | 1 | 0 | 0 | |
| 357 | RYAAWVEJL | 34 | 69 | 14 | 95 | 333 | RLJAWJCELL | 36 | 39 | 0 | 59 | 462 | KASWJQOV | 9 | 12 | 0 | 0 | 287 | KYICWJCEL | 13 | 27 | 0 | 0 | 48 | RLVDWJLRYA | 6 | 3 | 0 | 0 | |
| 520 | RLNMWJTV | 50 | 39 | 68 | 51 | 512 | KLJAWSQJV | 14 | 68 | 49 | 0 | 507 | RASWJLJAL | 5 | 46 | 10 | 0 | 15 | KJAEWJPLA | 20 | 18 | 0 | 0 | 246 | KACPWJHFL | 7 | 1 | 0 | 0 | |
| 535 | RVYWSJNV | 26 | 49 | 64 | 61 | 488 | KAKWSSNV | 10 | 43 | 77 | 0 | 310 | RADWJACEL | 15 | 36 | 0 | 8 | 272 | KJENWJLAKL | 20 | 17 | 0 | 0 | 464 | KIIDWJPKV | 3 | 5 | 0 | 0 | |
| 361 | RVLDWJPEL | 49 | 63 | 4 | 84 | 55 | RVJLWJALVA | 55 | 11 | 0 | 63 | 7 | KAKAWJALVA | 14 | 8 | 0 | 20 | 264 | KJKEWJSLJL | 10 | 26 | 0 | 0 | 136 | KVINWJHKI | 5 | 1 | 0 | 0 | |
| 509 | RJDMWJRPV | 5 | 66 | 85 | 42 | 271 | KLNCWJGSRL | 27 | 5 | 95 | 0 | 277 | KLJRWJHJGL | 28 | 7 | 5 | 0 | 257 | KJSEWJQVTL | 17 | 19 | 0 | 0 | 461 | KAREWJAKV | 5 | 1 | 0 | 0 | |
| 350 | RLSNWJNSJL | 50 | 66 | 20 | 60 | 345 | RLJAWJREL | 20 | 52 | 0 | 50 | 472 | KJVMJALQV | 7 | 2 | 31 | 0 | 265 | KJKEWJSLV | 9 | 27 | 0 | 0 | 477 | KLJFWJTHCV | 50 | 0 | 0 | 0 | |
| 355 | RLMGWJASJL | 30 | 69 | 10 | 83 | 22 | KLQFWJAVTA | 18 | 38 | 64 | 0 | 476 | KJLWJQJQV | 24 | 8 | 7 | 0 | 154 | RYMCWJLFL | 6 | 29 | 0 | 0 | 133 | KLJNWJGTII | 48 | 0 | 0 | 0 | |
| 331 | RLJCWJQJAL | 31 | 57 | 12 | 84 | 6 | KADWJNTJTA | 17 | 21 | 81 | 0 | 481 | KJLJWJNNJAV | 2 | 2 | 25 | 0 | 505 | RAJAWJCEWJ | 3 | 32 | 0 | 0 | 318 | RAQWJGJRL | 0 | 31 | 0 | 0 | |
| 511 | RLQJWJIAV | 59 | 41 | 35 | 46 | 261 | KLJWJMSJQL | 11 | 37 | 71 | 0 | 13 | KJNNWJLNHA | 10 | 1 | 15 | 0 | 289 | KYKDWJVERL | 20 | 15 | 0 | 0 | 487 | KVJFWJLEJLV | 0 | 29 | 0 | 0 | |
| 510 | RIJPMWJEGV | 24 | 42 | 61 | 51 | 34 | RAJMWJAVGA | 22 | 38 | 58 | 0 | 9 | KAKWJSTNA | 12 | 10 | 0 | 1 | 384 | KJAJWJASQV | 13 | 21 | 0 | 0 | 474 | KJWJEWJGV | 18 | 0 | 0 | 0 | |
| 366 | RVJPMJRGJL | 46 | 58 | 11 | 62 | 311 | RAJMWJCEJL | 38 | 61 | 0 | 19 | 484 | KLQJWJQJNGV | 1 | 3 | 10 | 0 | 384 | KJAWJASQV | 13 | 21 | 0 | 0 | 155 | RVJNDWJLJRI | 13 | 0 | 0 | 0 | |
| 329 | RTJYWGQJL | 24 | 42 | 61 | 49 | 276 | KLJRWJQJQVL | 50 | 21 | 46 | 0 | 41 | RIJPMWJPOA | 51 | 49 | 0 | 0 | 37 | KJCAMWJOLL | 19 | 15 | 0 | 0 | 140 | KJFWJLJRTI | 12 | 0 | 0 | 0 | |
| 364 | RVJMGWJSGJL | 39 | 47 | 15 | 75 | 314 | RAJPMJLEPWL | 26 | 35 | 0 | 54 | 309 | RAJWJHJVL | 53 | 39 | 0 | 0 | 23 | KJAEWJLJDA | 21 | 12 | 0 | 0 | 132 | KLJFWJLJELI | 0 | 6 | 0 | 0 | |
| 153 | RJDEWJTSI | 27 | 13 | 84 | 48 | 335 | RLJAWJMSJL | 26 | 23 | 0 | 66 | 43 | RVJAWJABRA | 57 | 32 | 0 | 0 | 260 | KJDNWJLEJL | 18 | 12 | 0 | 0 | 127 | KJAEWJLJAHJ | 4 | 0 | 0 | 0 | |
| 152 | RLQJWJLSJ | 28 | 40 | 22 | 65 | 130 | KJTWJLJCAI | 11 | 36 | 67 | 0 | 52 | RVJAWJMSRA | 25 | 64 | 0 | 0 | 139 | KJQWJNNJSEI | 8 | 20 | 0 | 0 | 486 | KLJSEWJLYV | 4 | 0 | 0 | 0 | |
| 359 | RVCCWJTPJL | 26 | 47 | 9 | 54 | 307 | RAJDMWJAEAL | 13 | 78 | 0 | 22 | 147 | RASWJHJPI | 40 | 46 | 0 | 0 | 465 | KJIPWJNSJRV | 9 | 19 | 0 | 0 | 467 | KJEWJLYV | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| 45 | RLJYWLJFA | 9 | 30 | 70 | 25 | 514 | RIJYAWJQJAV | 19 | 55 | 0 | 40 | 151 | RLQJWJCSJVI | 13 | 67 | 0 | 0 | 17 | KJIDWJLEDA | 23 | 4 | 0 | 0 | 120 | KJLEWJLJAFI | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| 39 | RLJHWJQJRA | 49 | 32 | 40 | 4 | 328 | RLJNWJNRJL | 54 | 38 | 0 | 21 | 31 | RAKJWJLJPGA | 38 | 41 | 0 | 0 | 137 | KJKEWJSLMJ | 1 | 25 | 0 | 0 | 473 | KJIVWJLJSLV | 2 | 0 | 0 | 0 | |
| 49 | RVJHWJCHGA | 30 | 29 | 61 | 5 | 44 | RLJAPWJLJLRA | 54 | 8 | 0 | 50 | 466 | KJLWJWJNV | 4 | 0 | 74 | 0 | 249 | KJASWJQJRWJL | 19 | 7 | 0 | 0 | 480 | KJLFWJLJTEV | 2 | 0 | 0 | 0 | |
| 32 | RAKJYLJERA | 12 | 29 | 75 | 7 | 513 | RJSPWJLJLVR | 27 | 35 | 0 | 51 | 308 | RAJWJLJPL | 14 | 59 | 0 | 0 | 460 | KJAWJIAJADV | 14 | 10 | 0 | 0 | 0 | 29 | KJRWMSJPA | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 50 | RVJYWLJLEVA | 15 | 31 | 56 | 18 | 53 | RVJGWJAPJRA | 24 | 36 | 27 | 0 | 274 | RAJWJLJPTL | 19 | 0 | 53 | 0 | 470 | KJTPWJSSJEV | 12 | 11 | 0 | 0 | 0 | 485 | KJLDWJHJHEV | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 16 | KLJGWHJRLA | 58 | 7 | 29 | 7 | 46 | RLJGWSJLJPA | 25 | 40 | 43 | 0 | 533 | RVJWJLJLSJVS | 13 | 39 | 0 | 0 | 266 | KJKEWJQJL | 8 | 15 | 0 | 0 | 0 | 479 | KLJFWJLJLEJVS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 527 | RVJFWSJLJVS | 2 | 31 | 50 | 10 | 5 | KADWJAVJGA | 18 | 15 | 0 | 70 | 28 | KVJPMWJQJRLA | 61 | 10 | 0 | 0 | 248 | KJAEWJCPJTL | 11 | 12 | 0 | 0 | 24 | KLJNWJLJRVJA | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 528 | RVJAWJMLJLV | 13 | 38 | 37 | 3 | 54 | RVJLGWJVAEA | 32 | 53 | 18 | 0 | 126 | KJPHWJNJR | 6 | 0 | 66 | 0 | | | | | | | | | | | | | |

Abbildung 16: Vergleich der Spezifitätsrepertoires der Mimotop-induzierten T-Zelllinien und des CTL-Klons PN2. Die mit 1 bis 4 nummerierten Spalten zeigen die Aktivität der T-Zellen in Zytotoxizitätsanalysen mit T2-Zellen als Zielzellen: Spalte 1-mit Peptid 347 induzierte T-Zelllinie aus Spender A; Spalte 2-mit Peptid 352 induzierte T-Zelllinie aus Spender A; Spalte 3-Klon PN2; Spalte 4-mit Peptid 347 induzierte T-Zelllinie aus Spender B. Zytolysedaten sind entsprechend der Zahl der reaktiven T-Zelllinie farblich wie folgt dargestellt: rot - von allen 4 T-Zelllinien erkannt; grün - von 3 T-Zelllinien erkannt, blau - von 2 T-Zelllinien erkannt; gelb - von einer T-Zelllinie erkannt. Die spezifischen Chromfreisetzungswerte sind auf 100% normalisiert (maximaler Chromfreisetzungswert > 30%). Die T-Zellreaktionen sind mit steigender Farbindensität (0-33%, 34-66%, 67-100%) in Abstufen dargestellt.

5.5 Induktion von Tumor-reaktiven T-Zellen *in vivo* durch Mimotopenvakzination

Wie in früheren Arbeiten gezeigt und hier bestätigt wurde, sind T-Zellen bei der Reaktion auf spezifische Epitope stark degeneriert, d.h. sie erkennen eine Vielzahl verschiedener Peptide. Damit ist es möglich, Mimotope zu generieren und für Vakzintherapien einzusetzen, die so ausgewählt sind, dass sie die gewünschte Immunantwort optimal induzieren. Es stellt sich aber die Frage, ob solche optimierte Epitope auch in Patienten Tumor-spezifische Immunantwort auslösen. Diese Frage konnte leider nicht mit den in dieser Arbeit bisher beschriebenen Peptiden bearbeitet werden, da der Patient WeW für eine Vakzintherapie nicht geeignet war. Für einen anderen T-Zellklon waren allerdings ebenfalls Mimotope mittels kombinatorischen Peptidbibliotheken generiert worden. Dieser CTL-Klon war spezifisch für die CTCL-Tumorzelllinie MyLa. Die für diesen Klon definierten Mimotope waren HLA-B8 restringiert und einem weit verbreiteten Tumor-assoziierten Antigen ähnlich, wie durch das Vorhandensein von Peptid-spezifischen T-Zellen in 80% (13/16) der untersuchten CTCL-Patienten gezeigt werden konnten (Linnemann, et al., 2001). Zwei HLA-B8-positive CTCL-Patienten wurden zur Vakzination mit den Mimotopen ausgewählt. Die Vakzinationsstudie wurde mit Einverständnis der Patienten sowie mit Genehmigung der Ethikkommission der Charite durchgeführt. Die Patienten wurden von Dr. Sylke Gellrich betreut. Patient 1 (75 Jahre, männlich) hatte klassisches MF – die Tumorerläsionen waren an Armen, Beinen und seitlich am Bauch lokalisiert. Die Diagnose für Patient 2 (59 Jahre, weiblich) war pleiomorphes grosszelliges CD30⁺-T-Zelllymphom. Die Tumorknoten waren an den oberen Bereich der unteren Extremitäten lokalisiert. Die Patienten hatten vor der Vakzination keine nachweisbaren Mimotop-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut. Die Mimotope PVKTYDIKL und PVKTKDIKL (je 100µg) wurden alle 4 Wochen zusammen mit Tuberkulin und Tetanus toxoid zur Stimulation von T-Helferzellen intradermal abseits der Tumorerläsionen injiziert. Die durch die Helferantigene Tuberkulin und Tetanustoxoid aktivierten CD4⁺-T-Zellen können die Mimotop-spezifischen CD8⁺-T-Zellen mit IL-2 und evtl. andere Kostimulationen z.B. über CD27/CD70-Interaktion unterstützen. Die aktivierten

CD4⁺-T-Zellen können zusätzlich die Aktivierung und Reifung von DC auslösen (Lanzavecchia, 1998), sodass die Peptidantigene von den APZ besser präsentiert und durch kostimulatorische Faktoren unterstützt werden können. Patient 1 hatte 3 und Patient 2 10 Injektion bekommen.

Beide Patienten zeigten komplette Remission nach einer initialen Tumorregression bereits nach der 1. Vakzination. Patient 1 hatte nach der 1. Vakzination Nachtfieber mit Schüttelfrost, Entzündungsreaktionen im Tumor und Juckreiz. Danach traten keine solche Nebenreaktionen mehr auf. 3 Monate nach der 3. Vakzination sind neue Tumorknoten aufgetaucht und der Patient entschied sich für eine Standardtherapie. Beim Patient 2 wurde eine substantielle Tumorreduktion nach der 3. Vakzination beobachtet. 3 Wochen später traten neue Knoten auf, die nach der 6. Vakzination wieder verschwanden. Der Patient war dann bis nach der 10. Vakzination tumorfrei. Leider traten 4 Wochen später wieder neue Tumorknoten am Thorax, Rücken und Oberarm auf. Im späteren leukämischen Endstadium erschienen Tumorzellen in peripheren Blut. Der Patient erhielt dann eine Chemotherapie.

Zur Untersuchung der immunologischen Effekte der Mimotopvakzination wurden Mimotop-reaktive T-Zellen jeweils an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 7 und 14 relativ zu den Vakzination durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 17, 18, 19**). Hierzu wurden PBMC von den Patienten mit den Mimotopen inkubiert und die T-Zellen, die daraufhin IFN γ exprimieren, spezifisch auf das intrazelluläre IFN γ angefärbt und per Durchflusszytometrie ausgezählt. Die Mimotop-spezifischen T-Zellen exprimierten den frühen Aktivierungsmarker CD69 und waren in der Lage *ex vivo* nach Peptidstimulation IFN γ zu produzieren. **Abb. 17** zeigt die intrazelluläre Färbung von Antigen-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut des Patienten 2 nach der 8. Mimotopvakzination. Der Patient war neben HLA-B8- auch HLA-A*0201-positiv, sodass das Peptid NLVPMVATV aus dem *immediate early protein pp65* von CMV (*Cytomegalovirus*) als positive Kontrolle genommen werden konnte. Die Frequenzen der T-Zellen für das CMV-Epitop schwankten zwischen 4% bis 15% der CD8⁺CD3⁺-T-Zellen im Blut.

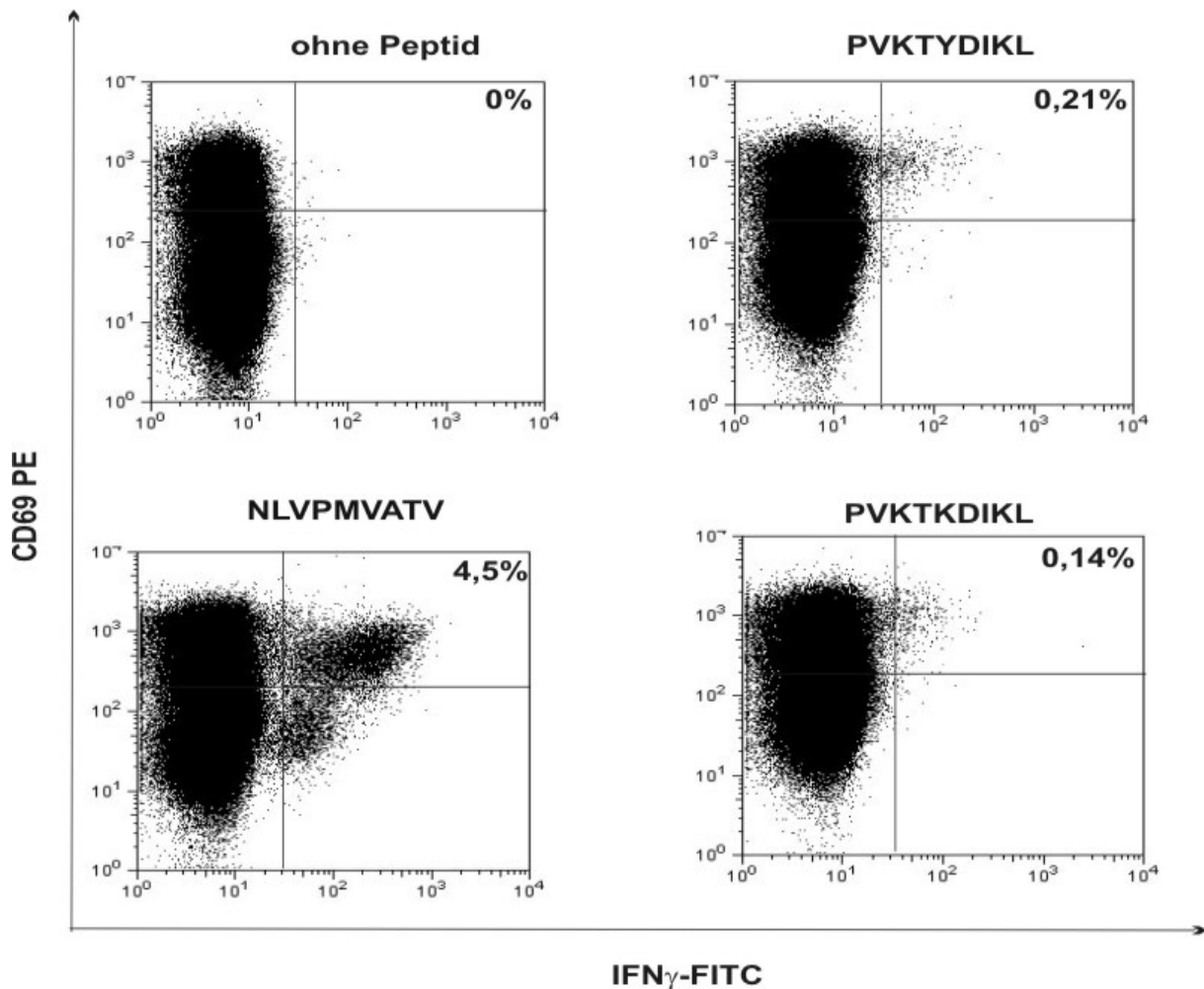


Abbildung 17: Intrazelluläre Analyse der IFN γ -Induktion in Antigen-spezifischen T-Zellen per Durchflusszytometrie aus dem peripheren Blut des Patienten 2 nach der 8. Mimotopvaktination. Hier wurden nur die CD3⁺CD8⁺-Zellen dargestellt. Als negative Kontrolle wurde PBMC ohne Peptid und als positive Kontrolle wurde PBMC mit PMA/Ionomycin (hier nicht gezeigt) oder mit dem CMV-Epitop NLVPMVATV inkubiert.

Die Frequenzen der Mimotop-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut erreichten nach der Vaktination bei Patient 2 maximal 0,5% und bei Patient 1 maximal 0,2% der CD3⁺CD8⁺-Zellen. **Abb. 18** zeigt die Frequenzen der Mimotop-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut des Patienten 1 für die 3 Vaktinationszyklen und **Abb. 19** die Verläufe im Fall von Patient 2. In beiden Fällen, aber besonders bei dem längeren Verlauf von Patient 2 zu sehen, wurde die maximale T-Zellreaktion früh während der Vaktinationstherapie erreicht. Später schwächte die Reaktion ab, blieb aber immer deutlich nachweisbar. Das Immunmonitoring von *in vivo* induzierten spezifischen T-Zellen zeigte Repertoireunterschiede bezüglich von der beiden Mimotop-induzierten T-Zellen. Die anfängliche T-Zellantwort bei Patient 2 auf das Peptid PVKTYDIKL war sofort nach der ersten Vaktination zu sehen, was zu kurz für eine primäre T-Zellantwort ist und darauf hindeutet, dass das Peptid eine sekundäre Immunantwort

stimuliert. Bei Peptid PVKTKDIKL hingegen war eine signifikante Reaktion erst nach wiederholter Vakzination zu sehen und stieg über die ersten Zyklen stetig an.

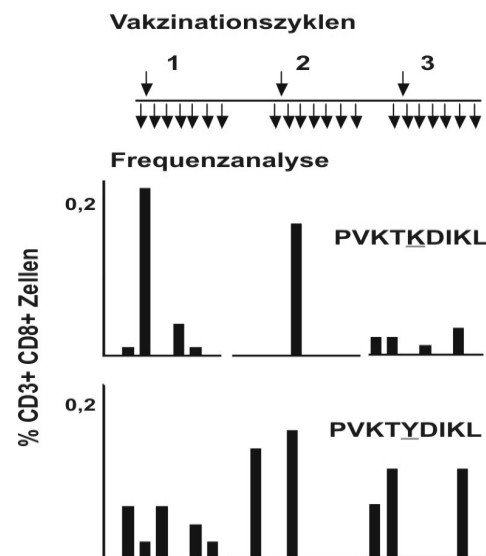


Abbildung 18: Frequenzanalyse von mimotop-spezifischen T-Zellen in Patient 1 nach der Vakzination. Verlauf der Entwicklung der T-Zellreaktion während der drei Vaktinationszyklen. Die Pfeile oberhalb der Zeitachse weist auf die Vakzinationszyklen, die unterhalb der Achse auf die Zeitpunkte für das Immunmonitoring.

Das Peptid PVKTKDIKL paßt exakt zum HLA-B8-spezifischen Epitopmotiv während Peptid PVKTYDIKL in der Sequenzposition 5 ein Tyrosin statt des kanonischen Lysins trägt. Bei Patient 2 ist ein ähnlicher Verlauf der Reaktionskinetik Mimotop-spezifischer T-Zellen zu erkennen.

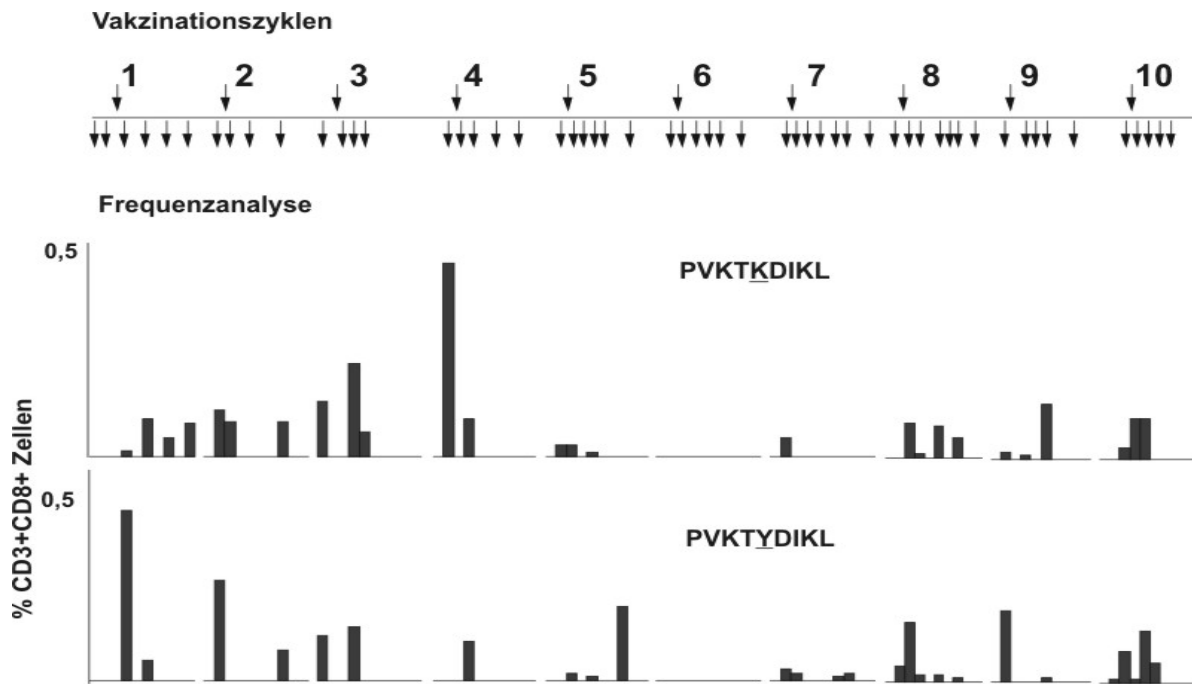


Abbildung 19: Frequenzanalyse der Mimotop-spezifischen T-Zellen in Patient 2 unter Vakzination. Wie in Abbildung 18 geben die Pfeile oberhalb und unterhalb der Zeitachse die Zeitpunkte für die Vakzination und für die Blutentnahme für das Immunmonitoring an.

5.6 Tumorreaktivität Mimotop-induzierter T-Zellen

Obwohl die Vakzination mit den beiden Mimotopen PVKTYDIKL und PVKTKDIKL in den Patienten Mimotop-spezifische T-Zellen induzieren, ist nicht klar, ob diese T-Zellen tatsächlich die Tumorzellen des Patienten erkennen und zerstören können. Um die Tumorspezifität und tumorizide Kapazität der Mimotop-spezifischen T-Zellen zu untersuchen, wurden Mimotop-reaktive T-Zellen aus dem Patienten 2 während einer Tumorfreien Phase unter Vakzination und während des leukämischen Endstadiums der Krankheit aus peripherem Blut isoliert und *in vitro* in IL-2-haltigem Medium durch regelmäßige Stimulation mit den Mimotopen expandiert. Die Zytotoxizität dieser Zellen wurden in ^{51}Cr -Freisetzungversuchen gegen autologe EBV-tranformierte B-Zellen mit den jeweiligen Mimotopen getestet. Beide T-Zelllinien lysierten die EBV-tranformierten B-Zellen in Abhängigkeit von den Mimotopen, wie in **Abb. 20a** für die frühere Linie und in **Abb. 20b** für die spätere Linie gezeigt ist. In beiden Fällen wurden die Mimotope von den CTL-Linien erkannt. Diese Mimotop-spezifische CTL lysierten auch die CTCL-Tumorzelllinie MyLa, die von einem anderen Patient stammte und ursprünglich für die Bestimmung der Mimotope verwendet wurden. Potentielle NK-Aktivitäten der CTL-Linien wurden durch Kontrolle mit der NK-sensitiven K562-Zelllinie ausgeschlossen.

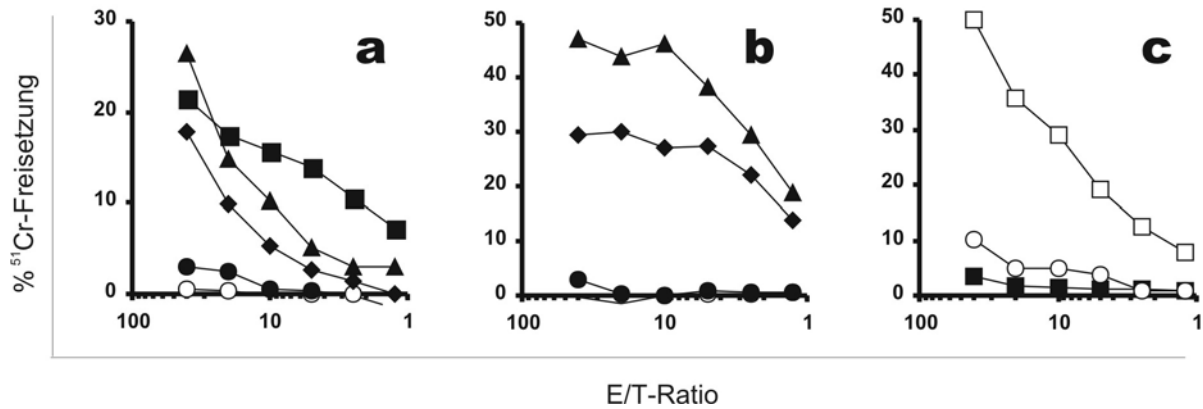


Abbildung 20: ^{51}Cr -Freisetzungsversuch mit Mimotop-spezifischen CTL, die während der Vakzination (a) oder während des leukämischen Endstadiums (b) bzw. mit CTL, die gegen das CMV-Epitop (c) gerichtet sind. Dargestellt sind die Effektor-zu-Target-Titrations. Zielzellen waren EBV-transformierte B-Zellen des Patienten oder heterogene MyLa-Tumorzellen oder NK-sensitive K562-Zellen. Offene Dreiecke: EBV-transformierte B-Zellen; gefüllte Dreiecke: diese Zellen in Gegenwart von Mimotop PVKTKDIKL; gefüllte Karos: diese Zellen in Gegenwart von Mimotop PVKTYDIKL; gefüllte Quadrate: MyLa-Tumorzellen; offene Quadrate: EBV-transformierte B-Zellen mit dem CMV-Epitop; gefüllte Kreise: K562-Zellen.

Als Kontrolle wurde aus Patient 2 eine CTL-Linie mit Spezifität für das Epitop NLVPMVATV aus dem *immediate early Protein pp65* von CMV generiert. Diese Linie lysierte die autologen EBV-transformierten B-Zellen in Abhängigkeit vom CMV-Peptid aber nicht die CTCL-Tumorzelllinie MyLa (**Abb. 20c**).

Aufgrund fehlender Marker konnten die Tumorzellen des Patienten nicht isoliert werden, sodass für den Nachweis der Tumorspezifität der CTL auf den molekulargenetischen Nachweis der Tumorzellen in PBMC zurückgegriffen werden musste. Die PCR-Analyse des TCR γ -Rearrangements des Tumors, hatte als Tumorklon-spezifische Signatur Amplifikate von 241 bp und 250 bp für die beiden Allele ergeben (**Abb. 21A**). Diese Signatur war während des leukämischen Endstadiums im peripheren Blut nachweisbar. Die Stärke dieses Tumor-spezifischen Signals wurde als Maß für die tumorizide Wirkung der CTL vor und nach Inkubation der PBMC mit diesen Zellen vermessen. **Abb. 21A** zeigt die Signatur des Tumor-spezifische TCR γ -Rearrangements, **Abb. 21B** die entsprechende Signatur für die Mimotop-spezifische CTL-Linie. Eine Mischung dieser beiden Zellpopulationen ergibt eine Kombination beider PCR-Profile (**Abb. 21C**). Nach Inkubation dieses Gemisches bei 37°C ist das Tumorklon-spezifische PCR-Amplifikat um etwa 83% reduziert (**Abb. 21D, 22A**), während das CTL-spezifische Amplifikat konstant bleibt. Alle Proben waren nach der Inkubation mit Benzonase (Sigma) 30 min bei 37°C behandelt worden, um die DNA aus den toten Zellen zu entfernen. Als Kontrolle wurden PBMC mit den Tumorzellen zusammen mit der CMV-spezifischen CTL-Linie inkubiert. Die Klon-spezifische Signatur dieser CTL-Linie

ist in **Abb. 21E**, das PCR-Profil des Gemisches von PBMC mit den Tumorzellen und CMV-spezifischen CTL vor Inkubation in **Abb. 21F** und nach Inkubation in **Abb. 21G** gezeigt. Hier bleibt das Tumor-spezifische Signal konstant. Die Tumorzellen wurden also nicht lysiert. Nach Zugabe des Epitops für die CTL (NLVPMVATV) verschwindet das Tumor-spezifische PCR-Produkt weitgehend, was zeigt, dass die Tumorzellen durchaus von den CMV-spezifischen T-Zellen lysiert werden können, wenn das richtige Antigen präsentiert wird.

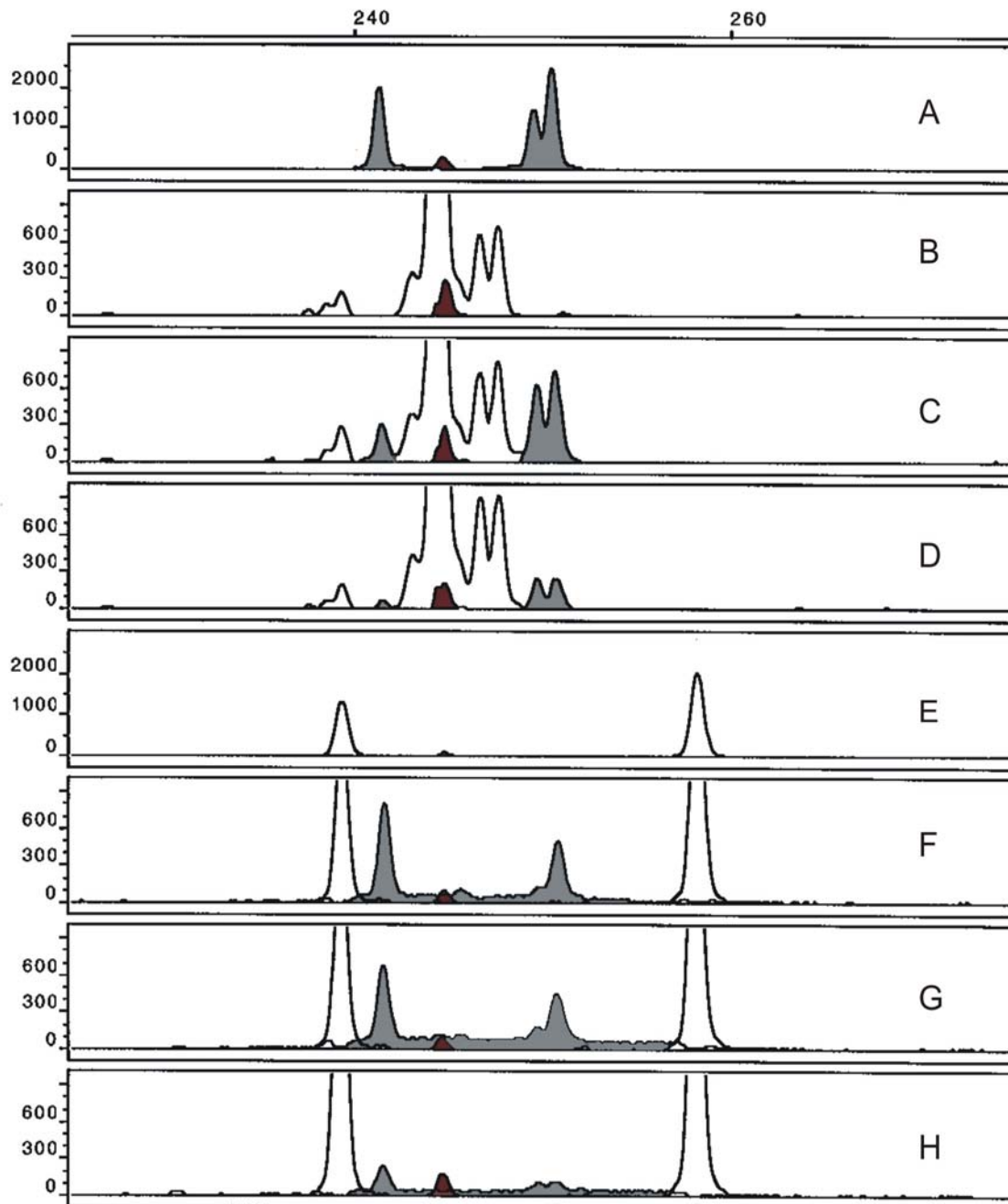


Abbildung 21: Tumorizide Kapazität von Mimotop-spezifischen CTL aus Patient 2. Fragmentlängenanalyse der Tumorzellen (A), Mimotop-spezifischen CTL (B), virus-spezifischen CTL (E), Tumorzellen vor der Inkubation zusammen mit Mimotop-spezifischen CTL (C) und mit Virus-spezifischen CTL (F), Tumorzellen nach der Inkubation mit Mimotop-spezifischen CTL (D), mit Virus-spezifischen CTL (G) und mit Virus-spezifischen CTL in Gegenwart vom CMV-Peptid (H). Das rote Pfeil ist ein Kalibrierungsmarker, d.h. ein Oligonukleotid mit 245 bp.

Die **Abb. 22A, B** stellen die Flächen der in **Abb. 21** gezeigten Profile der Tumor-spezifischen PCR-Produkte dar. Die Signalstärken wurden bezüglich der in den Assays eingesetzten DNA-Mengen kontrolliert und abgeglichen. Diese Experimente zeigen eindeutig, dass die Mimotop-spezifischen CTL im peripheren Blut des Patienten Tumor-spezifisch und potentiell tumorizid sind. Interessant ist, dass solche CTL im peripheren Blut des Patienten sowohl zum Zeitpunkt der kompletten Remission nach der 6. Vakzination als auch im leukämischen Endstadium nachgewiesen werden konnten, d.h. die Tumorprogression ist nicht mit einer Deletion der Tumor-spezifischen CTL assoziiert. Weiterhin lassen sich die Tumorzellen auch im späten aggressiven Stadium des Krankheitsverlaufs spezifisch lysieren. Sie präsentieren also nach wie vor das Antigen, exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle und sind sensitiv gegenüber dem lytischen Mechanismus der CTL. Die Tumorprogression ist daher wahrscheinlich auf eine Immunsuppression der CTL zurückzuführen, die durch Kultivierung in IL-2 haltigem Medium revertiert werden kann.

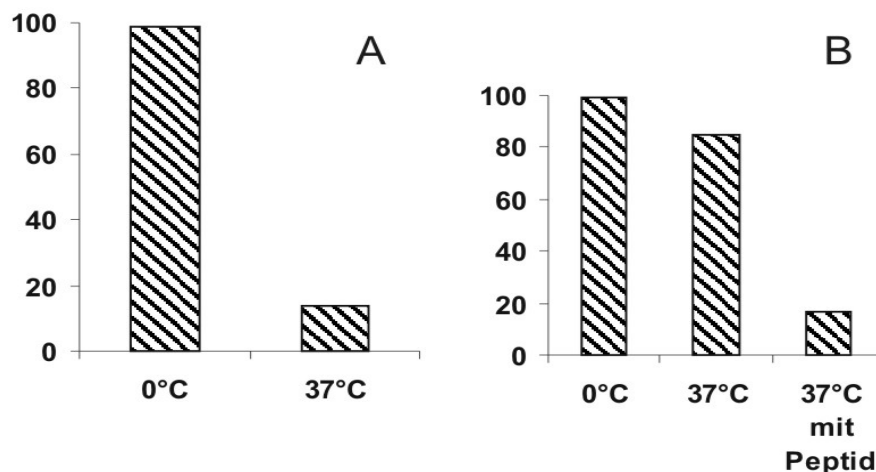


Abbildung 22: Spezifische Lyse der Tumorzellen im peripheren Blut des Patienten 2 durch Mimotop-spezifische CTL oder als Kontrolle CMV-spezifische CTL. Die Referenzwerte (in Prozent) für das Tumor-spezifische Signal mit Mimotop-spezifischen CTL (A) und mit Virus-spezifische CTL (B) vor der Inkubation (0°C) und nach der 4 h Inkubation (37°C), bzw. nach 4h bei 37°C in Gegenwart des CMV-Epitops (37°C mit Peptid).

6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei CTCL-Tumor-spezifische CTL-Klone etabliert und ihre Feinspezifität durch *positional scan* mit kombinatorischen Peptidbibliotheken bestimmt. Solche *scans* liefern Informationen über die bevorzugten Aminosäuren in den einzelnen Sequenzpositionen der Epitope. Diese Informationen können auf zweierlei Arten genutzt werden, um T-Zellepitope zu identifizieren. Erstens können die Reaktionsprofile in Suchmatrizen für Datenbanksuchen nach potentiellen Epitopen in den Sequenzdatenbanken umgesetzt werden. Zweitens können die bevorzugten Aminosäuren zu vollständigen Sequenzen kombiniert und damit Mimotope, Mimetika natürlicher T-Zellepitope, generiert werden. In beiden Fällen muss in nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob die Epitope und Mimotope tatsächlich von den T-Zellen erkannt werden. Für den Klon PN2 konnten durch Datenbanksuchen 250 potentielle Epitope identifiziert werden von denen 91 aktiv waren, d.h. Reaktionen der T-Zellen induzieren konnten. Zusätzlich waren 8 Mimotope konstruiert worden, die sich alle als aktiv erwiesen. Für Klon L1 ergab die Datenbanksuche nur 2 potentielle Epitope, die zwar beide potente Stimulatoren der T-Zellen waren, deren Präsenz in den Quellproteinen aber spezielle RNA-Splicevarianten voraussetzen, die in den Tumorzellen des Patienten nicht nachgewiesen werden konnten. Für diesen Klon wurden deswegen Mimotope durch Kombination der aktiven Aminosäuren konstruiert. Nahezu alle, insgesamt 60 Mimotope waren in T-Zellassays aktiv. Damit konnten für beide T-Zellklone zusammengekommen 159 neue Tumor-assoziierte T-Zellepitope identifiziert werden.

Die in diesen Ergebnissen deutliche hohe Degeneriertheit der Antigenerkennung ist eine typische Eigenschaft von T-Zellen und korreliert mit der nur schwach ausgeprägten Komplementarität der Interaktionsoberflächen von TCR und MHC-Peptidkomplexen {Evavold, 1995 #286; Brock, 1996 #481; Garcia, 1998 #28}. Udaka und Kollegen konnten mit kombinatorischen Peptidbibliotheksanalysen als erste zeigen, dass der Maus CTL-Klon 4G3 mindestens 10^4 verschiedene Oktapeptide erkennen kann (Udaka, et al., 1995). Eine komplette kombinatorische OX₈-Bibliothek enthält etwa 320×10^9 Nonapeptide, also alle möglichen Kombinationen der 19 proteinogenen Aminosäuren ohne Cystein in jeder der 9 Sequenzpositionen. Abschätzungen haben ergeben, dass eine T-Zelle 10^6 - 10^7 verschiedene MHC-Nonapeptid-Komplexe oder mehr als 10^8 verschiedene MHC-Undecapeptidkomplexe erkennen kann (Mason, 1998). Vielfach repräsentieren die von einem T-Zellklon erkannten Peptide Variationen eines Sequenzmotifs. Brock und Kollegen {Brock, 1996 #481} sowie

Wilson und Kollegen (Speir, et al., 1998) konnten allerdings zeigen, dass auch vollkommen unverwandte und unähnliche MHC-Peptidkomplexe von ein und demselben TCR erkannt werden können. Nicht alle diese Sequenzen kommen natürlicherweise vor und selbst wenn sie vorkämen, würde nur ein Teil der entsprechenden Peptide durch die Antigenprozessierungsmaschinerie der Zelle generiert und davon wiederum nur ein Teil an die MHC-Klasse-I-Moleküle der Zelle binden können. Die Kombination der Selektivitäten der einzelnen Komponenten und Prozesse, die zur Antigenprozessierung und –präsentation beitragen, hat einen wesentlichen Anteil an der Spezifität der Reaktionen von T-Zellen auf natürliche Antigene. Für die beiden hier untersuchten T-Zellklone konnten einmal 2 und beim zweiten Klon 250 potentielle natürliche Epitope in der Humangenomdatenbank gefunden werden. Die beiden potentiellen natürlichen Epitope für Klon L1 waren zwar aktiv, können aber, da die erforderliche Splicevariante nicht nachgewiesen werden konnten, nicht als Teil einer Proteinsequenz in den Tumorzellen exprimiert sein. Dieser negative Befund schließt allerdings nicht vollständig aus, dass diese Epitope nicht doch natürlicherweise generiert und von den MHC-Molekülen der Tumorzelle präsentiert werden. Es wurden bereits mehrfach von T-Zellepitopen berichtet, die aus Intronsequenzen oder aus nicht exprimierten Genen stammen (Bullock, et al., 1997; Cardinaud, et al., 2004; Ronsin, et al., 1999). Aufgrund der geringen Menge an Tumormaterial bei den CTCL-Patienten lässt sich diese Frage im vorliegenden Beispiel nicht klären. Für den Klon PN2 konnte für die 3 potentiellen Quellproteine für aktive T-Zellepitope Ceramidase, NDRG-1 und ein Tumorangioendeseprotein nachgewiesen werden, dass sie von den Tumorzellen des Patienten exprimiert werden. Diese drei Proteine sind sehr interessant, da sie verschiedene wichtige Prozesse in der Tumorentwicklung beeinflussen können.

Ceramidase ist ein Enzym, das Sphingophospholipide abbaut. Es gibt Hinweise für die Beteiligung von Ceramiden bei der Induktion der Apoptose und für die Blockade der Apoptose, wenn in den Zellen Ceramidase exprimiert ist. Ceramide werden durch Hydrolyse von Sphingophospholipiden (Sphingomyelin), die Bestandteile der Plasmamembran der Zellen sind, generiert. Danach induzieren Ceramide die Aktivierung von Stress-aktivierte Proteinkinasen wie JNK/SAPK (JNK, c-Jun N-terminal kinase; SAPK, stress activated protein kinase) (Verheij, et al., 1996). Die molekularen Mechanismen der JNK/SAPK-Aktivierung bis hin zur Apoptoseinduzierung sind noch unklar. Erhöhte Ceramidspiegel wurde bei Fas-vermittelter Apoptose beobachtet (Herr, et al., 1997; Tepper, et al., 1997). In der Fas-resistenten Prostata-Tumorzelllinie DU145 konnte durch den Ceramidase-Inhibitor

LCL405 Apoptose ausgelöst werden (Norris J. S. et al., Abstract, International Society for Cancer Gene Therapy, Singapore 2004).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander unter Verwendung unterschiedlicher Namen wie DRG1 (van Belzen, et al., 1997), Cap43 (Zhou, et al., 1998) oder rit43 (Kurdistani, et al., 1998) von demselben Protein berichtet. Nach diesen Arbeiten wird die Transkription, Translation und mRNA-Stabilität des Proteins durch verschiedene Zustände der Zellen wie Hypoxie, Zelldifferenzierung und Neoplasie oder unterschiedliche Faktoren wie Schwermetalle, Tunicamycin, Homocystein oder N-Myc reguliert. N-myc ist ein Transkriptionsfaktor der Oncogenfamilie myc und häufig in Tumoren wie Neuroblastomen amplifiziert bzw. mutiert. Die Überexpression dieses Gens scheint die Zelldifferenzierung zu blockieren und die Proliferation zu erhöhen. Zwei Mitglieder der myc-Familie, N-myc und c-myc, unterdrücken in der Maus die Expression von NDRG-1 (Shimono, et al., 1999). Die Aktivierung von p53 scheint eine erhöhte Expression von NDRG-1 zu bewirken (Kurdistani, et al., 1998; Yu, et al., 1999). Die Transkription des Gens ist ubiquitär, die Expression des Proteins aber hauptsächlich in Epithelzellen zu beobachten (Lachat, et al., 2002), was für das Protein auf eine Regulationen auf translationaler oder posttranslationaler Ebene hindeutet. Eine erhöhte Expression von NDRG-1-Protein wurde bei verschiedenen Tumoren wie Lungen-, Hirn-, Leber-, Brust- und Prostatakrebs sowie Melanomen beobachtet (Cangul, et al., 2002). Dagegen wurde in anderen Tumoren (Kurdistani, et al., 1998) wie auch in Embryonen (Kokame, et al., 1998; Shimono, et al., 1999) eine reduzierte Expression gefunden. Testosteron hat einen negativen Effekt auf die NDRG-1-Expression (Lin and Chang, 1997). Intrazellulär geht die Herabregulation des Proteins mit der Formierung eines N-myc/Max-Komplexes (Shimono, et al., 1999) einher. Eine erhöhte Expression von NDRG-1 korreliert mit einer reduzierten Proliferation von transformierten Zellen (Kurdistani, et al., 1998). Andererseits war die Expression in der Wachstumsphase höher als in der stationären Phase (Agarwala, et al., 2000). Diese Arbeiten deuten auf eine mögliche Rolle von NDRG-1 bei der Proliferation hin, was aber angesichts der zum Teil widersprüchlichen Beobachtungen noch genauer untersucht werden muss. Agarwala und Kollegen haben von minimal sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen auf NDRG-1 berichtet. Protein Kinase A phosphoryliert rekombinantes NDRG-1 *in vitro* direkt. Die phosphorylierte Form ist in frühen Log-Phase-Zellen reichlich vorhanden, fällt aber mit zunehmender Zelldichte ab. Andere Arbeiten deuten auf eine funktionelle Rolle von NDRG-1 bei der Zelladhäsion über die Beeinflussung der Bildung von E-cadherin/catenin-Komplexen (Bobryshev, et al., 1998; Sato, et al., 1998),

wobei die erhöhte Expression von E-cadherin mit der erhöhten Expression von NDRG-1 korrelierte.

Ähnlich wie beim NDRG-1 weisen eine Reihe von indirekten Beobachtungen auf eine Rolle des als Tumorangiogenesefaktor ausgewiesenen hypothetischen Proteins bei der Tumorangiogenese hin. Das Protein ist in Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert (Liu, et al., 2002). Northernblot- und in-situ-Hybridisierungs-Analysen belegen auch eine Expression in Epithelzellen. Bei Brust-, Prostata- und Darmkrebs zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden normalen Geweben eine erhöhte Expression des Proteins, die nach immunhistochemischen Untersuchungen mit erhöhten Expressionen von weiteren Oberflächenmolekülen wie E-Selektin (Nguyen, et al., 1997), $\alpha_v\beta_3$ Integrin, VCAM-(*vascular cellular adhesion molecule*)-1, ICAM-(*intercellular adhesion molecule*)-1 und -2, CD31, CD34, CD36 und CD44 (Polverini, 1996) in den Gefäßen der Tumoren in Vergleich zu normalen Gefäßen einhergeht. Die Funktion des hypothetischen Proteins ist noch unklar. Die vier nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen für Casein-Kinase-II könnten auf eine mögliche Rolle bei der Signaltransduktion hindeuten. In gesundem erwachsenem Gewebe findet außer bei Wundheilungen nach Verletzungen normalerweise keine Angiogenese statt. Damit stellt die Hemmung der tumorzellinduzierten Neoangiogenese theoretisch einen gut geeigneten Angriffspunkt für eine Tumorthherapie dar. In der antiangiogenetischen Tumorthherapie werden Inhibitoren spezifischer Angiogenesefaktoren eingesetzt {Birmingham, 2002 #479;Folkman, 2003 #480}. Die Aufklärung der genauen funktionellen Rolle des Tumorangiogenese-Proteins und seine Inhibierung könnte ein möglicher Ansatz für die Tumorthherapie sein.

Obwohl die Expression dieser potentiellen Quellproteine für PN2-Epitope gezeigt wurde und nachgewiesen werden konnte, dass normale Lymphozyten sie nicht exprimieren, sie also für die Differenzierungslinie der Lymphozyten Tumor-spezifisch sind, ist damit nicht belegt, dass die Epitope natürlicherweise präsentiert werden. Hier offenbart sich ein Nachteil der Identifizierung von T-Zellepitopen mit Hilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken. Andererseits, wie bereits diskutiert, beweist der fehlende Nachweis der Expression eines potentiellen Quellproteins für ein mit Bibliotheken definiertes Epitope nicht, dass die Zuordnung falsch ist. Wie diese Arbeit gezeigt hat, sind kombinatorische Peptidbibliotheken potente Instrumente für die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen besonders, wenn andere Verfahren aufgrund der raren und i.d.R. unzureichenden Tumormaterialien nicht

eingesetzt werden können. Für die biochemische Identifizierung von TAA wird in der Regel viel Tumormaterial gebraucht, welches bei CTCL äußerst selten und in früheren Stadien der Tumorerkrankung gar nicht zur Verfügung steht. Für die bioinformatischen Methoden müssen Kandidatengene für TAA bekannt sein, was bei CTCL mit Ausnahme des TCR der malignen Zelle nicht der Fall ist. Grundsätzlich kann man mit bioinformatischen Ansätzen keine neuen, bislang in dieser Funktion unbekannte TAA finden. Molekulargenetische Methoden setzen stabile Tumor-spezifische T-Zelllinien voraus und brauchen wegen der erforderlichen sukzessiven Selektionsschritte viel Zeit. Der Vorteil der Anwendung von kombinatorischen Peptidbibliotheken bei der Identifizierung von TAA ist, dass mit wenig Tumormaterial und mit wenigen T-Zellversuchen simultan eine Reihe von TAA identifiziert werden können. Die Identifizierung von Serien ähnlicher Epitope, die alle von den Tumor-spezifischen T-Zellen erkannt werden, bietet eine gute Voraussetzung für die Entwicklung von optimierten Vakzinantigenen. Es stellt sich aber die Frage, ob komplett artifizielle Mimotope, die keine natürlichen Korrelate in der humanen Genomdatenbank haben, überhaupt Tumor-spezifische T-Zellen induzieren können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Frage für Mimotope untersucht, die bereits früher identifiziert worden waren und für die weder identische noch ähnliche Sequenzen in den Datenbanken gefunden werden konnten. Diese Mimotope, PVKTKDIKL und PVKTYDIKL, die beide für die Präsentation durch das HLA-Allomorph HLA-B8 konstruiert worden waren, wurden von T-Zellen in mehr als 80% der CTCL-Patienten, die dieses HLA hatten, erkannt (Linnemann, et al., 2001). In gesunden Individuen konnten T-Zellen mit dieser Spezifität gar nicht oder nur in äußerst geringen, eher zweifelhaften Frequenzen nachgewiesen werden. In den CTCL-Patienten hingegen waren diese Frequenzen stark erhöht. Diese Befunde lassen vermuten, dass es sich bei den beiden Peptiden um Mimetika eines weit verbreiteten CTCL-Tumor-assoziierten Antigens handelt. Bei Vakzinationsversuchen bei zwei MF-Patienten, bei denen vor der Vakzinierung keine Mimotop-spezifische T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar waren, konnten nach wiederholter Mimotopvakzinierung die spezifischen T-Zellen konstant nachgewiesen werden (Tumenjargal, et al., 2003). Beim Peptid PVKTKDIKL mit der besseren HLA-Bindung konnten Anstiege der Frequenz spezifischer T-Zellen während der ersten vier Vakzinationszyklen beobachtet werden. Das Immunmonitoring während der Vakzination mit dem anderen Peptid PVKTYDIKL zeigte bereits nach der ersten Vakzination eine starke Induktion spezifischer T-Zellen nach bereits einem Tag bis zwei Tagen, was für eine primäre Induktion von spezifischen T-Zellen zu schnell ist und auf eine sekundäre Immunantwort hinweist. D.h. die T-Zellen waren bereits vorher, möglicherweise durch den Tumor induziert

worden. Da die Tumorzellen selbst in der Regel nur unzureichende Stimulatoren für T-Zellen sind, waren vermutlich andere Antigen-präsentierende Zellen, eventuell dendritische Zellen, in die Induktion der primären T-Zellantwort involviert. Diese zum Teil neu induzierten, zum Teil restimulierten Mimotop-spezifischen T-Zellen konnten aus einem der Patienten isoliert und in Zellkultur expandiert werden. In Zytotoxizitätsanalysen mit Tumorzellen des Patienten erwiesen sich diese T-Zellen als Tumor-spezifisch und tumorizid. Mimotope können also, selbst wenn sie artifiziell generiert und ohne erkennbare Ähnlichkeit mit einem potentiellen natürlichen Gegenstück in den Genomdatenbanken sind, potente Induktoren Tumor-spezifischer Immunreaktionen und damit für die Entwicklung therapeutischer Vakzine für die Krebsbehandlung wertvoll sein.

Alternativ zum kombinatorischen Bibliotheksansatz wurden Mimotope mehrfach durch gezielte Modifikation von bekannten Tumor-assoziierten T-Zellepitopen entwickelt. Das Ziel der Entwicklung solcher modifizierter Epitope war eine effektivere T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen Tumoren (Brinckerhoff, et al., 1999; Chen, et al., 2000; Clay, et al., 1999; Fisk, et al., 1995; Rivoltini, et al., 1999; Salazar, et al., 2000; Tourdot, et al., 2000; Valmori, et al., 1998a). Die Modifikationen in den Epitopen können dabei sein:

- Verbesserung der HLA-Bindungseigenschaft der Peptide (Valmori, et al., 1998a) durch Optimierung der Ankerpositionen,
- - Erhöhung der biologischen Halbwertszeit durch Modifizierung der N- oder C-terminalen Enden (Hin, et al., 1999),
- - Entwicklung von superagonistischen Varianten mit effizienterer Wechselwirkung mit dem TCR (Udaka, et al., 1996).

Für alle diese Ansätze gibt es in der Literatur wie auch in der hier vorgelegten Arbeit Beispiele. Der Austausch von Alanin zu Leucin in Ankerposition 9 beim L1-Peptid Nr. 66 steigerte die Aktivität des CTL-Klons L1 um mehr als das zweifache. Da hierbei eine schwache mit einer starken Ankeramino-säure ersetzt wurde, ist die stärkere T-Zellantwort vermutlich durch eine bessere Bindung des Peptids an das HLA-Molekül bedingt. Bei anderen Peptiden wurde eine verbesserte T-Zellreaktion bei Erhaltung der Besetzung der Ankerpositionen erreicht. Hier wurde vermutlich die Interaktion mit dem TCR optimiert. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Autoren für polyklonale T-Zellen berichtet. Rivoltini und Kollegen haben mit der superagonistischen Variante von Melan-A/MART-1₂₇₋₃₅ mit einem Leucin statt Alanin in der zweiten Sequenzposition des Epitops *in vitro* quantitativ

und qualitativ bessere anti-Melan-A/MART-1 T-Zellantworten induzieren können (Rivoltini, et al., 1999). Mit dieser superagonistischen Variante des natürlichen Epitops stimulierte CD8⁺-T-Zellen aus einem Melanompatienten produzierten peptidabhängig IL-2 in Reaktion auf eine autologe Melanomzelllinie, was für T-Zellen die mit dem natürlichen Epitop induziert worden waren, nicht der Fall war (Dutton, 1996). Auch andere T-Zellreaktionen wie Zytolyse und IFN γ -Produktion wurden mit dem Superagonisten deutlich effizienter induziert als mit dem natürlichen Epitop. Eine Analysen der TCR-V β der durch das Mimotop und durch das Epitop induzierten T-Zellen hatte gezeigt, dass es sich hierbei um unterschiedliche T-Zellpopulationen innerhalb der Melan-A/MART-1₂₇₋₃₅-reaktiven T-Zellrepertoire handelte. D.h. mit der superagonistischen Variante werden andere T-Zellen angesprochen als mit der natürlichen Variante, wobei beide T-Zellpopulationen die Tumorzellen erkennen und zerstören können.

Es gibt allerdings auch *in vitro* Untersuchungen, die zeigen, dass man bei der Benutzung von solchen modifizierten TATE vorsichtig sein sollte (Chen, et al., 2000; Kersh, et al., 2001; Nielsen, et al., 2000). Die Stimulation von zwei Melan-A/MART-1₂₆₋₃₅ spezifischer CTL-Klone mit einer modifizierten Variante des MART/Melan-Epitops, bei der Asparaginsäure in Position 6 durch Phenylalanin ersetzt wurde, führte überraschenderweise neben der Zunahme von Th1-Zytokinen wie IFN γ auch zur Zunahme von Th2-Zytokinen wie IL-10 und IL-13, was mit einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung in den reagierenden Zellen korreliert war (Nielsen, et al., 2000). Da Th2-Zytokine wie IL-10 immunsuppressiv auf die anti-Tumor Immunantwort wirken, könnte dies fatale Folgen haben. Bei der superagonistischen Variante hingegen beobachtete man zwar auch eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung aber die IL-10-mRNA-Mengen waren im Vergleich zur Stimulation mit dem natürlichen Epitop reduziert.

Die Bindungsaffinitäten der beiden MART-1-Varianten für das MHC-Molekül sind sowohl experimentiell in funktionellen Peptidkompetitionsversuchen als auch theoretisch nach SYFPEITHI-Datenbank-Abschätzungen vergleichbar und 5-fach höher als die des natürlichen Epitops (Valmori, et al., 1998a; Valmori, et al., 1998b), d.h. die erhöhte Aktivierung der CTL-Klone kann nicht allein mit der Bindungseigenschaften der Peptid für das MHC-Molekül erklärt werden. Die Autoren der zitierten Arbeiten vermuten, dass der Austausch von Alanin zu Leucin in Position 2 zu einer effizienteren Interaktion mit dem TCR führt, wodurch eine volle im Gegensatz zu einer suboptimalen Aktivierung der T-Zelle mit dem natürlichen Epitop erreicht wird. Warum allerdings nach Verbesserung der MHC-Bindungseigenschaft

des anderen Peptids zwar eine stärkere T-Zellreaktion aber mit der Induktion von IL-10 und IL-13 eine eher immunsuppressive Wirkung erreicht wurde (Nielsen, et al., 2000), ist noch nicht verstanden. Diese Daten zeigen, dass es durchaus möglich ist, mit Mimotopen eine quantitativ wie qualitativ effektivere T-Zellreaktion gegen Tumorzellen zu induzieren, wobei auch ein anderes, in verschiedenen Beispielen wesentlich breiteres T-Zellrepertoire angesprochen werden kann (Clay, et al., 1999; Gundlach, et al., 1996; La Rosa, et al., 2001; Linnemann, et al., 2001). Andererseits muss für jedes Mimotop untersucht werden, ob nicht auch eine unerwünschte weil immunsuppressive oder antagonistische Reaktion erzeugt wird.

Die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen für CTCL gibt zum ersten Mal die Möglichkeit Tumor-spezifische T-Zellen bei dieser Tumorart zu untersuchen. Diese T-Zellen können mit MHC-Oligomeren, die mit den jeweiligen Peptiden spezifisch beladen sind, angefärbt und dann durchflußzytometrisch quantifiziert und phänotypisch analysiert werden. Mit Hilfe von rekombinanten HLA-A2.1-Dimeren (Hu, et al., 2004; Woll, et al., 2004) mit den in dieser Arbeit identifizierten Tumor-assoziierten Epitopen und Mimotopen konnten mit 0,89-20% der $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen relativ hohe Frequenzen Tumor-spezifischer T-Zellen im Tumor des Lymphompatienten WeW nachgewiesen werden. Diese hohe Frequenzen belegen die Immunogenität dieser Art von Tumor und zeigen, dass das Immunsystem auf dem Tumor reagiert und dass die Tumor-spezifischen T-Zellen in Reaktion auf den Tumor proliferiert sind, d.h. der Tumor wird vom Immunsystem des Patienten erkannt und bekämpft. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet, die einen Anstieg der Frequenzen Tumor-spezifischer T-Zellen im Verlauf der Tumorprogression sowie nach Immuntherapien fanden. Powell und Rosenberg berichteten, dass nach der Immunisierung mit einem modifizierten gp100-Peptid die Frequenzen Tumorepitop-spezifischer T-Zellen in peripheren Bluten von Melanompatienten von durchschnittlich 4,8% auf durchschnittlich 38,1% anstiegen (Powell and Rosenberg, 2004). Allerdings sind derart hohe Frequenzen von Tumor-spezifischen T-Zellen selten. In der Regel wird von Frequenzen zwischen 0,03% und 5% berichtet (Lee, et al., 1999; Trefzer, et al., 2004), was im Vergleich zu akuten EBV-Infektionen, bei denen von bis zu 40% spezifische T-Zellen gegen ein einzelnes EBV-Epitop berichtet wird (Callan et al., 1996), als relativ niedrig erscheint. Aber auch bei den Immunreaktionen auf Virusinfektionen sind die Spannbreiten sehr groß und für Influenzainfektionen z.B. wird selten von mehr als 1% spezifischer T-Zellen berichtet (Lucas, et al., 2004), wobei bei Influenza eine sterile Immunität erreicht wird, bei EBV-Infektionen aber nicht. Die im peripheren Blut gemessenen Frequenzen für die spezifischen T-Zellen

korrelieren also nicht direkt mit der Effektivität der zellulären Immunreaktion. Die Tatsache, dass trotz hoher Frequenzen von Tumor-spezifischen T-Zellen *in vivo* in *limiting dilution assays* nur 4% der ausgewachsenen CD8⁺-T-Zellen tumor-reaktiv waren, könnte auf eine Anergie der Tumor-spezifischen T-Zellen hindeuten. Eine alternative Erklärung wäre eine niedrige Avidität dieser Zellen bei intakter Funktionskapazität. Dabei könnten TAA-spezifische T-Zellen aufgrund einer geringen Avidität zwar auf extern applizierte synthetische Peptide reagieren aber nicht auf die natürlich prozessierten auf den Tumorzellen (Dutoit, et al., 2001).

Die intrinsische Affinität eines TCR für den korrespondierenden MHC-Peptidkomplex ist experimentell schwer zugänglich, da dafür monovalente Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen vermessen werden müssen, die normalerweise in der Zellmembran verankert sind. In einzelnen Fällen konnten lösliche Varianten eines TCR und des MHC-Peptidkomplexes hergestellt und für solche Messungen eingesetzt werden. Die dabei bestimmten Affinitäten von TCR zu Peptid-MHC-Komplexen sind mit Dissoziationskonstanten von 10^{-4} bis 10^{-6} M relativ niedrig im Vergleich zur Affinität von B-Zellrezeptoren (BCR) mit 10^{-7} - 10^{-12} M (Eisen, et al., 1996; Valitutti and Lanzavecchia, 1997). Da diese Messungen aufgrund des hohen technischen Aufwands bei der Generierung löslicher TCR auf einzelne Beispiele beschränkt blieben, wurden verschiedene indirekte Bestimmungsmethoden entwickelt, die sich leichter auf beliebige Situationen übertragen lassen. Häufig wird in Inhibitionsexperimenten mit blockierenden anti-MHC Antikörpern (Amrani, et al., 2000; Lee, et al., 1999), unmarkierten Tetrameren (Dutoit, et al., 2002; Valmori, et al., 2002) oder anti-TCR-Fab-Fragmenten (Blattman, et al., 2002) oder in Tetramerdissoziationsexperimenten ohne blockierende Reagenzien (Busch and Pamer, 1999; Rubio-Godoy, et al., 2001) eine relative Affinität oder Avidität bestimmt. Es gibt derzeit zwei auf der Verwendung von MHC-Tetrameren basierenden Methoden zur Messung der TCR-Avidität für spezifische MHC-Peptidkomplexe. Mehrere Gruppen haben eine Korrelation zwischen MHC-Tetramer-Bindungsintensität und T-Zellavidität zeigen können und geben als Avidität eine relative Messgröße abhängig von der per Durchflußzytometrie bestimmten Intensität der Färbung mit den MHC-Tetrameren an (Crawford, et al., 1998; Dutoit, et al., 2001; Fahmy, et al., 2001; Lee, et al., 1999; Rees, et al., 1999). Andere haben zur Bestimmung der Avidität die Dissoziationskinetik von MHC-Tetrameren von den spezifisch gefärbten T-Zellen bestimmt und zur Unterscheidung verschiedener T-Zellpopulationen mit der gleicher Spezifität angewandt (Amrani, et al., 2000; Blattman, et al., 2002; Busch and Pamer, 1999; Dutoit, et

al., 2002; Rubio-Godoy, et al., 2001; Savage, et al., 1999; Valmori, et al., 2002). Diese Arbeiten haben gezeigt, dass die TCR-Avidität für spezifische MHC-Peptidkomplexe eine wichtige Rolle bei der Gestaltung des reifen T-Zellrepertoires, der Induktion der peripheren Toleranz gegen Selbstantigene und bei der Deletion selbstreaktiver T-Zellen spielt. Die Avidität der TCR von T-Zellpopulationen ist also T-Zell-entwicklungsbiologisch reguliert.

Im Gegensatz zur Avidität und Affinität des TCR ist die FA eines T-Zellklons relativ einfach als Peptidkonzentration, die für halb-maximale Reaktion erforderlich ist, bestimmbar. Bei unseren Dissoziationsmessungen mit löslichen MHC-Tetramerpeptidkomplexen mit zwei T-Zelllinien korrelierte die FA mit der Bindungsstärke des TCR-MHC-Peptidkomplexes. Je stärker die Bindung des TCR-MHC-Peptidkomplexes war, desto stärker war auch die FA. Gleiche Beobachtungen wurden auch von Dutoit und Kollegen gezeigt (Dutoit, et al., 2002). Dagegen wurden Diskrepanzen zwischen TCR-MHC-Tetramerbindungsintensität und der FA berichtet (Derby, et al., 2001; Dutoit, et al., 2001; Dutoit, et al., 2002; Kalergis, et al., 2001; Rubio-Godoy, et al., 2001). Die Ursache dafür konnte an den unterschiedlichen Färbungsprotokollen der Autoren liegen.

Nach Aktivierung einer T-Zellpopulation durch spezifische Antigenstimulierung ist eine Erhöhung der TCR-Avidität der T-Zellen festzustellen (Fahmy, et al., 2001; Slifka and Whitton, 2001). Diese Aviditätserhöhung ist zum einen mit der Selektion hochavidere T-Zellen erklärbar, zum anderen aber auch mit Veränderungen in der Physiologie der T-Zellen. Nach Antigenkontakt werden B-Zellen mit höherer BCR-Affinität selektiv expandiert (Janeway et al., 2001). Im Gegensatz zu B-Zellen fehlt den T-Zellen aber die Möglichkeit, ihre Rezeptoraffinität zum Antigen durch somatische Hypermutation zu steigern (Janeway et al., 2001). Daher wird die Optimierung der zellulären Immunität nur durch selektive Expansion bereits vorhandener T-Zellen mit höherer TCR-Affinität für das Antigen erfolgen. Dementsprechend wurde von verschiedenen Autoren von einer relativ geringen Steigerung der TCR-Affinität um das 2-4-fache bei einer sekundären Immunantwort im Vergleich zur primären Antwort beobachtet (Busch and Pamer, 1999; Savage, et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurde von Slifka und Whitton für die funktionelle Avidität eine mehr als 50-fache Steigerung beschrieben, wobei jeweils monoklonale T-Zellen analysiert wurden (Slifka and Whitton, 2001). Die Autoren erklären ihre Ergebnisse mit einer Optimierung der Signaltransduktionsmaschinerie der T-Zelle. Die erhöhte Expression von *lck* korrelierte mit einer erhöhten IFN γ -Produktion. Bezüglich der Expression von Adhäsionsmolekülen gab es

hingegen keine Unterschiede. Es gibt einzelne Beobachtungen, die zeigen, dass hochavide T-Zellen im Gegensatz zu niederaviden T-Zellen gegen die Tumorzellen reagieren können. Yee und Kollegen haben anhand der Intensität der Färbung von T-Zellen einer heterogenen Population mit Peptid-MHC-Tetrameren hochavide T-Zellen sortiert, *in vitro* expandiert und dann gezeigt, dass diese im Gegensatz zu niederaviden T-Zellen Tumor-reaktiv waren (Yee, et al., 1999). Im Gegensatz zu den nicht Tumor-reaktiven T-Zellen beobachteten die Autoren eine Peptid-spezifische Zytolyse bei weniger als 10 ng/ml Peptid. Andere Autoren haben unterschiedliche Aviditäten von Tumor-spezifischen T-Zellen bei Patienten und Gesunden beobachtet (Rezvani, et al., 2003). Auch bei der Induktion der IFN γ -Produktion war dieser Unterschied deutlich. Zur Stimulation der TAA-reaktiven T-Zellen aus Patienten waren 1-10 μ M Peptid erforderlich, bei Gesunden aber nur 0,1 μ M. Im Gegensatz dazu haben wir nachweisen können, dass es hochavide Tumor-spezifische T-Zellen in Tumoren gibt (eigene Arbeiten, in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dabei konnten wir aus dem Tumor eines Melanompatienten eine CD8⁺-T-Zelllinie isolieren, die spezifisch für das bekannte Melanom-assoziierte Antigen MART-1/Melan A war, und die Avidität des TCR dieser Zellen als Halbwertszeit der Dissoziation spezifischer MHC-Peptidtetramere von den Zellen bestimmen. Diese $t_{1/2}$ -Werte waren mit etwa 40 Stunden sehr lang und vergleichbar mit den Halbwertszeiten, die wir für T-Zellen mit Spezifität für virale Epitope gemessen hatten. Die hochaviden Tumor-spezifischen T-Zellen konnten auch die autologen Tumorzellen, die das entsprechende Antigen exprimierten, antigenabhängig lysieren. Ein Vergleich verschiedener T-Zelllinien mit Spezifitäten für Tumor-assoziierte und virale Epitope ergab, dass es für beide Klassen an Spezifitäten - einmal gegen Selbstantigene und zum anderen gegen Fremdanigene - eine vergleichbare Verteilung von hoch- und niederaviden T-Zellen gab. Während es also Hinweise gibt, dass in manchen Fällen eine niedrige Avidität der Tumor-spezifischen T-Zellen die Erklärung dafür sein könnte, dass die Tumorzellen trotz hoher Frequenzen an Tumor-spezifischen T-Zellen expandieren, gibt es auch Gegenbeispiele, die eine fehlende Korrelation belegen.

Eine zweite Erklärung wäre, dass die Tumor-spezifischen T-Zellen in den Patienten funktionell defekt, also anerg sind. Die Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor des Patienten WeW zeigten zum größeren Teil einen besonderen Phänotyp, der sich weder den *effector memory* noch den *central memory* Zellen zuordnen lässt. Klar ist hingegen, dass diese Zellen anerg sind. So wird der Transferinrezeptor CD71 nicht exprimiert, was bedeutet, dass diese Zellen nicht proliferieren. Die reduzierte Expression von Granzym B und fehlende Expression

von Perforin belegen zudem, dass sie nicht über die für die Zerstörung der Tumorzellen erforderliche zytolytische Maschinerie verfügen. Auch der alternative zytotoxische Mechanismus über Fas-induzierte Apoptose ist nicht verfügbar, da die T-Zellen Fas-Ligand nicht exprimieren. Die Tumor-spezifischen T-Zellen haben also weder das Effektorinstrumentarium der *effector memory* noch die Proliferationskapazität der *central memory* Zellen. Mit dieser funktionellen Anergie korreliert auch die Expression der CD45-Isoformen und das Fehlen von CCR7. Auf der anderen Seite belegen die hohe Frequenzen dieser Zellen, dass sie vorher proliferiert und damit funktionell aktiv gewesen sein müssen. Dieser Gegensatz deutet auf Mechanismen im Tumor, die vorher aktive Tumor-spezifische T-Zellpopulationen inaktivieren. Verschiedene solcher Mechanismen werden als Ursache für das Versagen der Immunreaktionen gegen Tumoren diskutiert:

1. Erschöpfung der Tumor-spezifischen T-Zellen aufgrund der Überzahl an Tumorzellen;
2. Tolerisierung der T-Zellen durch die Tumorzellen wegen fehlender Kostimulation;
3. Ignoranz des Tumors aufgrund suboptimaler Antigenpräsentation was zu ausbleibender Stimulation der T-Zellen führt;
4. Suppression der Tumor-spezifischen T-Zellen durch immunsuppressive Faktoren, die von den Tumorzellen sezerniert werden;
5. Suppression der Tumor-spezifischen T-Zellen durch regulatorische T-Zellen im Tumor.

Eine Erschöpfung von Antigen-spezifischen T-Zellen durch ein Überangebot von Antigen war in Zellkulturen wie auch in Tierexperimenten *in vivo* beobachtet worden (Fields et al., 1992). Bei den Tierversuchen wurden TCR-transgene Mäuse generiert, deren Antigen in der Leber durch Gabe eines Induktors spezifisch zur Expression gebracht werden konnte. Die Autoren berichten von Schäden in der Leber, die auf zytotoxische Aktivitäten hindeuten, ohne dass die Funktion des Organs beeinträchtigt war. Die spezifischen T-Zellen allerdings waren nicht mehr nachweisbar, was annehmen lässt, dass sie aufgrund der Erschöpfung starben. Im Tumor des Patienten WeW dagegen waren die spezifischen T-Zellen noch vorhanden, zeigten keine für eine Apoptose typischen Veränderungen und ließen sich *ex vivo* durch Kultivierung in IL-2-haltigem Medium wieder reaktivieren. Die Ursache für die Anergie muss also eine andere sein als die in dem Tiermodell für erschöpfungsassoziierte Eliminierung der Zellen. Für die zweite mögliche Erklärung gibt es verschiedene experimentelle Beispiele, die zeigen, dass die primäre Induktion von T-Zellen mit Antigen ohne Kostimulation zu einen anergen Zustand der Zellen führt, der dann aber durch Gabe von kostimulierenden Zytokinen aufgehoben werden kann (Tan et al., 1993). Auch die anergen T-Zellen aus dem Tumor des

Patienten WeW konnten mit IL-2 zu aktiven Zellen konvertiert werden. Gegen die dritte Erklärung, zu wenig Antigen für eine Aktivierung der T-Zellen im Tumor, spricht, dass diese Zellen im Tumor angereichert zu sein scheinen. Sie müssen also auf ihre spezifischen MHC-Peptidkomplexe im Tumor reagiert haben.

Aktive Suppression von Tumor-spezifischen T-Zellen in Tumoren ist eine der am häufigsten formulierten Erklärungen für die fehlende Effizienz der Tumor-spezifischen Immunreaktionen. Für kutane T-Zelllymphome wurde von Assadullah und Kollegen gezeigt, dass das immunsuppressive Zytokin IL-10 im Verlauf der Erkrankung zunehmend stark exprimiert wird (Asadullah, et al., 1996). Im Fall des Patienten WeW konnte dies nicht bestätigt werden. Bei den Arbeiten von Assadullah und Kollegen blieb auch ungeklärt, ob dieses Zytokin von den Tumorzellen oder von Tumor-infiltrierenden Zellen produziert wird. Im Gegensatz zum IL-10 war beim Patienten WeW eine starke Expression des immunsuppressiven Zytokins TGF- β nachzuweisen. TGF- β -Expression wurde schon für eine Reihe anderer Tumoren nachgewiesen (Esser, et al., 2001; Steiner, et al., 1994; Tsamandas, et al., 2004). Auch für kutane Lymphome gibt es einen ersten Bericht von der Arbeitsgruppe von Bagot (Bagot, et al., 2001), wobei die Autoren allerdings nicht unterscheiden konnten, ob die Tumor- oder die Tumor-infiltrierenden Zellen dieses Zytokin exprimierten. Im Fall des Patienten WeW ist hingegen klar, dass die Tumorzellen und nicht die Tumor-infiltrierenden Zellen die Quelle für TGF- β sind.

In letzter Zeit gab es verstärkt Berichte von verschiedenen Arbeitsgruppen, dass eine spezielle Subpopulation an CD4⁺-T-Zellen, die gleichzeitig auch den hochaffinen IL-2-Rezeptor CD25 exprimieren, immunsuppressive Eigenschaften haben und einen wesentlichen Anteil an der Erhaltung der Autotoleranz haben (Sakaguchi, et al., 2001; Shevach, et al., 2001). Vereinzelt wurden Zellen mit dem CD4⁺CD25⁺-Phänotyp auch in Tumoren nachgewiesen und postuliert, dass sie für die fehlende Effektivität der Tumor-spezifischen Immunreaktionen mitverantwortlich sein könnten (Liyanage, et al., 2002; Woo, et al., 2002). In Mäusen wurden besonders von der Arbeitsgruppe von Hayday eine Reihe weiterer T-Zelltypen gefunden, die ebenfalls immunsuppressiv sind und denen eine Rolle beim Erhalt der peripheren Toleranz zugeschrieben wird (Girardi, et al., 2002; Hayday, 2000). Dabei wurden CD8⁺, CD4⁻CD8⁻-doppelt negative, $\gamma\delta$ und *natural killer* T-Zellen (NKT) mit regulatorischen, d.h. suppressiven, Funktionen beschrieben. Regulatorische oder suppressor T-Zellen (Treg) können die Aktivierung von potentiell schädlichen selbst-reaktiven T-Zellen verhindern und laufende T-

Zellantworten modulieren (Roncarolo and Levings, 2000). Dies könnte bei T-Zellantworten gegen Tumoren eine wichtige Rolle spielen, besonders wenn dabei Selbstantigene das Ziel dieser Immunreaktionen sind. Auch Tumor-spezifische $CD4^+$ -T-Zellen mit regulatorischen Funktion wurden aus TIL von Krebspatienten isoliert (Wang, et al., 2004). Diese exprimierten CD25 und GITR und suppressierten die Proliferation von naïven $CD4^+$ -T-Zellen auf anti-CD3-Antikörper-Stimulation (Wang, et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten keine konventionellen $CD4^+CD25^+$ -Tregs im Tumor des Patienten WeW nachgewiesen werden. Allerdings war unter den TIL eine sehr ungewöhnliche $CD8^+$ -T-Zellpopulation zu finden, welche die Oberflächenmoleküle GITR und CTLA-4, die gewöhnlich mit Suppressor-T-Zellen assoziiert sind (Liu, et al., 2003; McHugh, et al., 2002), exprimieren. Diese Zellen könnten ein neuer Typ von regulatorische T-Zellen sein. Die Expression von TGF- β durch die Tumorzellen könnte diese Treg-Population induzieren. Eine Rolle von TGF- β bei der Induktion von $CD8^+$ -Treg wurde in Mitte der neunziger Jahre beschrieben (Rich, et al., 1995). Maus $CD8^+$ -T-Zellen hatten nach der Stimulation mit Staphylococcal enterotoxin B und TGF- β 1 erhöhte Mengen an TGF- β und IL-10 sekretiert und inhibierten die Proliferation von anderen T-Zellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-2 plus TGF- β $CD4^+$ -Tregs mit Zell-Zell-Kontakt-abhängigen und Zytokin-unabhängigen Suppressionseigenschaften induzieren kann (Horwitz, et al., 2003). Nakamura und andere haben gezeigt, dass Zell-kontaktabhängige Suppression durch $CD4^+CD25^+$ -Treg durch membrangebundenes TGF- β verursacht wird (Nakamura, et al., 2001). Treg-Zellen exprimieren sowohl TGF- β auf der Zellmembran als auch den dazugehörenden Rezeptor T β RII. Dies könnte erklären, warum Tregs selbst funktionell inaktiv und nach TCR-Stimulation kein IL-2 machen. Durch die Bindung von TGF- β an den T β RII wird T β RI phosphoryliert. T β TII und T β RI sind Serin-Threonin-Kinasen. Als Folge werden cytosolische Proteine wie SMAD 2 und SMAD 3 phosphoryliert und zusammen mit SMAD-4 in den Zellkern transportiert, wo die Transkription von spezifischen Genen induziert wird (Genestier, et al., 1999; Roberts, 2002). Die *ex vivo* mit IL-2 und TGF- β generierten $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -Tregs suppressierten *graft-versus-host disease* und lymphoide Hyperplasien (Zheng, et al., 2004).

Schlussfolgerungen:

Mit Hilfe der neu identifizierten CTCL-assozierten T-Zellepitope und Mimotope konnten mit dieser Arbeit zum ersten Mal Tumor-spezifische T-Zellen bei kutanen Lymphomen untersucht werden. Diese T-Zellen waren in hohen Frequenzen im Tumor nachweisbar, müssen also expandiert sein, was auf eine starke Immunogenität dieser Tumoren hinweist.

Die großen Unterschiede in den Frequenzen Tumor-spezifischer T-Zellen, die mit MHC-Oligomeren mit verschiedenen Mimotopen desselben natürlichen Epitops nachgewiesen werden konnten, belegen, dass das Tumor-spezifische T-Zellrepertoire über die Wahl des Mimotops gesteuert werden kann. Die Untersuchungen ergaben, dass die Tumor-spezifischen T-Zellen im Tumor nahezu vollständig anerg waren, d.h. sie waren nicht mehr in einem aktiven Proliferationszyklus und exprimierten keines der beiden für die Zytolyse essentiellen Effektormoleküle Perforin und Granzym B. Die Gründe für diese Anergie sind nicht vollständig aufgeklärt aber nach den hier vorgestellten Untersuchungen mit größter Wahrscheinlichkeit auf eine Tumor-assoziierte Immunsuppression zurückzuführen, die entweder mit einer direkten Wirkung des von den Tumorzellen produzierten TGF- β auf die Tumor-spezifischen T-Zellen oder mit einer indirekten Wirkung über die Induktion von Suppressor-T-Zellen zusammenhängt. T-Zellen mit einem ungewöhnlichen Suppressorphänotyp konnten im Tumor nachgewiesen werden. Möglicherweise spielen verschiedene Faktoren bei der Blockade der T-Zellen zusammen. Auf jeden Fall ist der anerge Zustand reversibel. Sowohl *ex vivo* durch Kultivierung in IL-2-haltigem Medium als auch *in vivo* durch Vakzination können die T-Zellen in einen aktiven, tumoriziden Zustand überführt werden.

7 Zusammenfassung

Ziele der Arbeit waren die Identifizierung von Tumor-assoziierten T-Zellepitopen (TATE) bei kutanen T-Zelllymphomen (CTCL) und die Charakterisierung der Tumor-spezifischen zytotoxischen Immunantwort. Die zytotoxischen T-Zellen (CTL) erkennen TATE im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen und können dann die Tumorzellen zerstören. Die Identifizierung von TATE bei verschiedenen Tumorarten bietet zum einen die Möglichkeit, die natürliche Wechselwirkung zwischen den Tumorzellen und Tumor-spezifischen T-Zellen zu untersuchen, zum anderen sind sie neue antigene Zielstrukturen für Immuntherapien. Für CTCL sind bis heute nur wenige TATE aus dem T-Zellrezeptor (TCR) der malignen Zelle sowie Mimotope eines unbekannten Antigens bestimmt worden. Diese im Gegensatz zu anderen Krebsarten wie z. B. Melanomen geringe Kenntnis zur antigenen Struktur der Tumorzelle ist darin begründet, dass die für die Identifizierung von TATE erforderlichen Tumormengen nicht zu Verfügung stehen, die Tumorerläsionen in der Regel nur zu einem geringen Teil aus Tumorzellen bestehen und die Tumorzellen nicht in Kultur gehalten und expandiert werden können. Um trotz dieser ungünstigen Ausgangssituation TATE für CTCL zu identifizieren, wurde ein Epitop-Design-Ansatz mit kombinatorischen Peptidbibliotheken gewählt. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass auch bei unzureichenden Ausgangsmaterialien Informationen zu den antigenen Strukturen der Tumorzelle erhalten werden können. Zudem eröffnen die Bibliotheksscans einen detaillierten Einblick in die Spezifität und das Repertoire der Tumor-reaktiven T-Zellen.

Aus einer Läsion eines CTCL-Patienten wurden 68 T-Zellklone generiert und für zwei dieser Klone mit einer Kombination von Durchflußzytometrie, Zytotoxizitätsanalysen und molekulargenetischer Detektion der Tumorzellen nachgewiesen, dass sie spezifisch für die Tumorzelle des Patienten sind. Mit diesen Klonen wurden nach Bestimmung ihrer Spezifitätsprofile mit kombinatorischen Peptidbibliotheken insgesamt 159 potentielle T-Zellepitope (64 davon Mimotope mit unbekannten natürlichen Korrelaten) identifiziert. Diese Peptide dokumentieren einen hohen Grad an Degeneriertheit der Spezifität Tumor-reaktiver T-Zellen. Gleichzeitig können diese Zellen aber auch sehr ähnlichen Peptide unterscheiden. Die Reaktionsprofile der T-Zellen variieren mit dem eingesetzten Peptid, sodass die Zytolysefunktion der T-Zelle teilweise nicht mit der IFN γ -Produktion korreliert.

Mit Hilfe der mit dieser Arbeit neu definierten TATE konnten zum ersten Mal die Tumorspezifischen T-Zellen in CTCL untersucht werden. Der Großteil dieser Zellen wies einen bisher noch nicht beschriebenen Phänotyp auf und konnte weder den bekannten *central memory* noch den *effector memory* Zellen zugeordnet werden. Ausserdem wurden CD8⁺-T-Zellen gefunden, die GITR und CTLA-4 exprimieren, welche mit Immunsuppressorzellfunktionen assoziiert werden aber bisher nur für CD4⁺-T-Zellen beschrieben wurden. Diese Zellen könnten eine neue Klasse regulatorischer T-Zellen (Tregs) repräsentieren und einen Einfluss auf die Tumor-spezifischen Immunreaktionen haben.

Mimetika von TATE, sogenannte Mimotope, könnten als Impfstoffe gegen Krebs eingesetzt werden. Sie bieten die Möglichkeit, unterschiedliche T-Zellrepertoires für die Zerstörung der Krebszellen zu aktivieren und helfen, krankheitsbedingte Immuntoleranzen gegen den Tumor zu umgehen. Andererseits war aber noch nicht erwiesen, dass solche Mimotope in Patienten tatsächlich Tumor-spezifische T-Zellen induzieren können. Bei Immuntherapieversuchen mit CTCL-spezifischen Mimotopen, die mit Hilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken generiert wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Mimotopvakzination effektive Immunreaktionen gegen den Tumor induzieren. Zwei Patienten, die therapeutisch vakziniert wurden, erlebten einen kompletten Rückgang der Krankheit. Da bei CTCL Spontanheilungen nicht beschrieben wurden, kann vom therapeutischen Effekt der Mimotopvakzine ausgegangen werden. T-Zellen mit Mimotop- und Tumor-Spezifität wurden nach Injektion der Peptide im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen. Diese Zellen exprimierten den Aktivierungsmarker CD69 und waren funktionell aktiv.

Mit dieser Arbeit konnten für CTCL neue TATE (natürliche Epitope und Mimotope) identifiziert werden. Mit Hilfe dieser TATE wurden Tumor-spezifische T-Zellen direkt im Tumor nachgewiesen und neue Information zu ihrer Physiologie gewonnen. Die Möglichkeit der therapeutischen Verwertung dieser Mimotope wurde in zwei Patienten nachgewiesen.

8 Literaturverzeichnis

- Abelev, G. I.; Perova, S. D.; Khramkova, N. I.; Postnikova, Z. A. and Irlin, I. S. (1963): Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas, Transplantation 1, pp. 174-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14010646
- Agarwala, K. L.; Kokame, K.; Kato, H. and Miyata, T. (2000): Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein, Biochem Biophys Res Commun 272 [3], pp. 641-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10860807
- Amrani, A.; Verdaguer, J.; Serra, P.; Tafuro, S.; Tan, R. and Santamaria, P. (2000): Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population, Nature 406 [6797], pp. 739-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10963600
- Asadullah, K.; Docke, W. D.; Haeussler, A.; Sterry, W. and Volk, H. D. (1996): Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA, J Invest Dermatol 107 [6], pp. 833-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8941670
- Bachmair, A. and Varshavsky, A. (1989): The degradation signal in a short-lived protein, Cell 56 [6], pp. 1019-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2538246
- Bagot, M.; Echchakir, H.; Mami-Chouaib, F.; Delfau-Larue, M. H.; Charue, D.; Bernheim, A.; Chouaib, S.; Boumsell, L. and Bensussan, A. (1998): Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma, Blood 91 [11], pp. 4331-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9596682
- Bagot, M.; Nikolova, M.; Schirm-Chabanette, F.; Wechsler, J.; Boumsell, L. and Bensussan, A. (2001): Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas, Ann N Y Acad Sci 941, pp. 31-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11594580
- Berger, C. L.; Longley, J.; Hanlon, D.; Girardi, M. and Edelson, R. (2001): The clonotypic T cell receptor is a source of tumor-associated antigens in cutaneous T cell lymphoma, Ann N Y Acad Sci 941, pp. 106-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11594564
- Berger, C. L.; Wang, N.; Christensen, I.; Longley, J.; Heald, P. and Edelson, R. L. (1996): The immune response to class I-associated tumor-specific cutaneous T-cell lymphoma antigens, J Invest Dermatol 107 [3], pp. 392-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8751976
- Bernengo, M. G.; Novelli, M.; Quaglino, P.; Lisa, F.; De Matteis, A.; Savoia, P.; Cappello, N. and Fierro, M. T. (2001): The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells, Br J Dermatol 144 [1], pp. 125-35. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11167693
- Bjorkman, P. J.; Saper, M. A.; Samraoui, B.; Bennett, W. S.; Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature* 329 [6139], pp. 506-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3309677
- Blake, J.; Johnston, J. V.; Hellstrom, K. E.; Marquardt, H. and Chen, L. (1996): Use of combinatorial peptide libraries to construct functional mimics of tumor epitopes recognized by MHC class I-restricted cytolytic T lymphocytes, *J Exp Med* 184 [1], pp. 121-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8691125
- Blattman, J. N.; Antia, R.; Sourdiv, D. J.; Wang, X.; Kaech, S. M.; Murali-Krishna, K.; Altman, J. D. and Ahmed, R. (2002): Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells, *J Exp Med* 195 [5], pp. 657-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11877489
- Blom, B.; Verschuren, M. C.; Heemskerk, M. H.; Bakker, A. Q.; van Gastel-Mol, E. J.; Wolvers-Tettero, I. L.; van Dongen, J. J. and Spits, H. (1999): TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation, *Blood* 93 [9], pp. 3033-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10216100
- Bobryshev, Y. V.; Lord, R. S.; Watanabe, T. and Ikezawa, T. (1998): The cell adhesion molecule E-cadherin is widely expressed in human atherosclerotic lesions, *Cardiovasc Res* 40 [1], pp. 191-205. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9876332
- Bowman, M. R.; Crimmins, M. A.; Yetz-Aldape, J.; Kriz, R.; Kelleher, K. and Herrmann, S. (1994): The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27, *J Immunol* 152 [4], pp. 1756-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8120384
- Braciale, T. J. and Braciale, V. L. (1991): Antigen presentation: structural themes and functional variations, *Immunol Today* 12 [4], pp. 124-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1711855
- Brinckerhoff, L. H.; Kalashnikov, V. V.; Thompson, L. W.; Yamshchikov, G. V.; Pierce, R. A.; Galavotti, H. S.; Engelhard, V. H. and Slingluff, C. L., Jr. (1999): Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines, *Int J Cancer* 83 [3], pp. 326-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10495424
- Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature* 364 [6432], pp. 33-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8316295
- Bullock, T. N.; Patterson, A. E.; Franlin, L. L.; Notidis, E. and Eisenlohr, L. C. (1997): Initiation codon scanthrough versus termination codon readthrough demonstrates

- strong potential for major histocompatibility complex class I-restricted cryptic epitope expression, J Exp Med 186 [7], pp. 1051-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9314554
- Busch, D. H. and Pamer, E. G. (1999): T cell affinity maturation by selective expansion during infection, J Exp Med 189 [4], pp. 701-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989985
- Butterfield, L. H.; Koh, A.; Meng, W.; Vollmer, C. M.; Ribas, A.; Dissette, V.; Lee, E.; Glaspy, J. A.; McBride, W. H. and Economou, J. S. (1999): Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein, Cancer Res 59 [13], pp. 3134-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10397256
- Cangul, H.; Salnikow, K.; Yee, H.; Zagzag, D.; Commes, T. and Costa, M. (2002): Enhanced expression of a novel protein in human cancer cells: a potential aid to cancer diagnosis, Cell Biol Toxicol 18 [2], pp. 87-96. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12046693
- Cardinaud, S.; Moris, A.; Fevrier, M.; Rohrlisch, P. S.; Weiss, L.; Langlade-Demoyen, P.; Lemonnier, F. A.; Schwartz, O. and Habel, A. (2004): Identification of cryptic MHC I-restricted epitopes encoded by HIV-1 alternative reading frames, J Exp Med 199 [8], pp. 1053-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15078897
- Carreno, B. M. and Collins, M. (2002): The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses, Annu Rev Immunol 20, pp. 29-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11861596
- Castelli, C.; Storkus, W. J.; Maeurer, M. J.; Martin, D. M.; Huang, E. C.; Pramanik, B. N.; Nagabhushan, T. L.; Parmiani, G. and Lotze, M. T. (1995): Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes, J Exp Med 181 [1], pp. 363-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7807017
- Chen, J. L.; Dunbar, P. R.; Gileadi, U.; Jager, E.; Gnjjatic, S.; Nagata, Y.; Stockert, E.; Panicali, D. L.; Chen, Y. T.; Knuth, A.; Old, L. J. and Cerundolo, V. (2000): Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL, J Immunol 165 [2], pp. 948-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10878370
- Clay, T. M.; Custer, M. C.; McKee, M. D.; Parkhurst, M.; Robbins, P. F.; Kerstann, K.; Wunderlich, J.; Rosenberg, S. A. and Nishimura, M. I. (1999): Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue, J Immunol 162 [3], pp. 1749-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973438
- Coulie, P. G.; Lehmann, F.; Lethe, B.; Herman, J.; Lurquin, C.; Andrawiss, M. and Boon, T. (1995): A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by

- cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [17], pp. 7976-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7644523
- Crawford, F.; Kozono, H.; White, J.; Marrack, P. and Kappler, J. (1998): Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes, *Immunity* 8 [6], pp. 675-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9655481
- Dal Porto, J.; Johansen, T. E.; Catipovic, B.; Parfiit, D. J.; Tuveson, D.; Gether, U.; Kozlowski, S.; Fearon, D. T. and Schneck, J. P. (1993): A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [14], pp. 6671-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8341685
- Denzin, L. K. and Cresswell, P. (1995): HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading, *Cell* 82 [1], pp. 155-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7606781
- Derby, M. A.; Wang, J.; Margulies, D. H. and Berzofsky, J. A. (2001): Two intermediate-avidity cytotoxic T lymphocyte clones with a disparity between functional avidity and MHC tetramer staining, *Int Immunol* 13 [6], pp. 817-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11369710
- Dereure, O.; Portales, P.; Clot, J. and Guilhou, J. J. (2000): Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas, *Br J Dermatol* 143 [6], pp. 1205-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11122022
- Ding, Y. H.; Smith, K. J.; Garboczi, D. N.; Utz, U.; Biddison, W. E. and Wiley, D. C. (1998): Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids, *Immunity* 8 [4], pp. 403-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9586631
- Dutoit, V.; Rubio-Godoy, V.; Dietrich, P. Y.; Quiqueres, A. L.; Schnuriger, V.; Rimoldi, D.; Lienard, D.; Speiser, D.; Guillaume, P.; Batard, P.; Cerottini, J. C.; Romero, P. and Valmori, D. (2001): Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity, *Cancer Res* 61 [15], pp. 5850-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11479225
- Dutoit, V.; Rubio-Godoy, V.; Doucey, M. A.; Batard, P.; Lienard, D.; Rimoldi, D.; Speiser, D.; Guillaume, P.; Cerottini, J. C.; Romero, P. and Valmori, D. (2002): Functional avidity of tumor antigen-specific CTL recognition directly correlates with the stability of MHC/peptide multimer binding to TCR, *J Immunol* 168 [3], pp. 1167-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11801651
- Dutton, R. W. (1996): The regulation of the development of CD8 effector T cells, *J Immunol* 157 [10], pp. 4287-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8906801

- Echchakir, H.; Mami-Chouaib, F.; Vergnon, I.; Baurain, J. F.; Karanikas, V.; Chouaib, S. and Coulie, P. G. (2001): A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma, *Cancer Res* 61 [10], pp. 4078-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11358829
- Edelman, J. and Meyerson, H. J. (2000): Diminished CD3 expression is useful for detecting and enumerating Sezary cells, *Am J Clin Pathol* 114 [3], pp. 467-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10989648
- Eichmuller, S. (2002): Towards defining specific antigens for cutaneous lymphomas, *Onkologie* 25 [5], pp. 448-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12415200
- Eichmuller, S.; Usener, D.; Thiel, D. and Schadendorf, D. (2003): Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity, *Int J Cancer* 104 [4], pp. 482-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12584747
- Eisen, H. N.; Sykulev, Y. and Tsomides, T. J. (1996): Antigen-specific T-cell receptors and their reactions with complexes formed by peptides with major histocompatibility complex proteins, *Adv Protein Chem* 49, pp. 1-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8908296
- Esser, P.; Grisanti, S. and Bartz-Schmidt, K. (2001): TGF-beta in uveal melanoma, *Microsc Res Tech* 52 [4], pp. 396-400. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11170298
- Fahmy, T. M.; Bieler, J. G.; Edidin, M. and Schneck, J. P. (2001): Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen, *Immunity* 14 [2], pp. 135-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11239446
- Falk, K.; Rotzschke, O.; Stevanovic, S.; Jung, G. and Rammensee, H. G. (1994): Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules, *Immunogenetics* 39 [4], pp. 230-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8119729
- Fischer, J. R.; Schindel, M.; Stein, N.; Lahm, H.; Gallati, H.; Krammer, P. H. and Drings, P. (1995): Selective suppression of cytokine secretion in patients with small-cell lung cancer, *Ann Oncol* 6 [9], pp. 921-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8624296
- Fischer, T. C.; Gellrich, S.; Muche, J. M.; Sherev, T.; Audring, H.; Neitzel, H.; Walden, P.; Sterry, W. and Tonnies, H. (2004): Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas, *J Invest Dermatol* 122 [3], pp. 579-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15086538
- Fisk, B.; Savary, C.; Hudson, J. M.; O'Brian, C. A.; Murray, J. L.; Wharton, J. T. and Ioannides, C. G. (1995): Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for

- optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction, *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 18 [4], pp. 197-209. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8680648
- Flad, T.; Spengler, B.; Kalbacher, H.; Brossart, P.; Baier, D.; Kaufmann, R.; Bold, P.; Metzger, S.; Bluggel, M.; Meyer, H. E.; Kurz, B. and Muller, C. A. (1998): Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method, *Cancer Res* 58 [24], pp. 5803-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9865739
- Fleckenstein, B.; Kalbacher, H.; Muller, C. P.; Stoll, D.; Halder, T.; Jung, G. and Wiesmuller, K. H. (1996): New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library, *Eur J Biochem* 240 [1], pp. 71-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8797837
- Fleischer, B. (1994): CD26: a surface protease involved in T-cell activation, *Immunol Today* 15 [4], pp. 180-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7911022
- Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R. and Honjo, T. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J Exp Med* 192 [7], pp. 1027-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11015443
- Fremont, D. H.; Matsumura, M.; Stura, E. A.; Peterson, P. A. and Wilson, I. A. (1992): Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb, *Science* 257 [5072], pp. 919-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1323877
- Galy, A.; Verma, S.; Barcena, A. and Spits, H. (1993): Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development, *J Exp Med* 178 [2], pp. 391-401. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7688021
- Garboczi, D. N.; Ghosh, P.; Utz, U.; Fan, Q. R.; Biddison, W. E. and Wiley, D. C. (1996): Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2, *Nature* 384 [6605], pp. 134-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8906788
- Garcia, K. C.; Degano, M.; Pease, L. R.; Huang, M.; Peterson, P. A.; Teyton, L. and Wilson, I. A. (1998): Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen, *Science* 279 [5354], pp. 1166-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9469799
- Genestier, L.; Kasibhatla, S.; Brunner, T. and Green, D. R. (1999): Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell

- death in T cells via downregulation of c-Myc, *J Exp Med* 189 [2], pp. 231-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9892606
- Girardi, M.; Lewis, J.; Glusac, E.; Filler, R. B.; Geng, L.; Hayday, A. C. and Tigelaar, R. E. (2002): Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation, *J Exp Med* 195 [7], pp. 855-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11927630
- Guilloux, Y.; Lucas, S.; Brichard, V. G.; Van Pel, A.; Viret, C.; De Plaen, E.; Brasseur, F.; Lethe, B.; Jotereau, F. and Boon, T. (1996): A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene, *J Exp Med* 183 [3], pp. 1173-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8642259
- Gundlach, B. R.; Wiesmuller, K. H.; Junt, T.; Kienle, S.; Jung, G. and Walden, P. (1996): Specificity and degeneracy of minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CTL, *J Immunol* 156 [10], pp. 3645-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8621898
- Guy-Grand, D.; Cerf-Bensussan, N.; Malissen, B.; Malassis-Seris, M.; Briottet, C. and Vassalli, P. (1991): Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation, *J Exp Med* 173 [2], pp. 471-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1824857
- Hasegawa, H.; Nomura, T.; Kohno, M.; Tateishi, N.; Suzuki, Y.; Maeda, N.; Fujisawa, R.; Yoshie, O. and Fujita, S. (2000): Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells, *Blood* 95 [1], pp. 30-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607681
- Hayday, A. C. (2000): [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection, *Annu Rev Immunol* 18, pp. 975-1026. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10837080
- Hemmer, B.; Fleckenstein, B. T.; Vergelli, M.; Jung, G.; McFarland, H.; Martin, R. and Wiesmuller, K. H. (1997): Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone, *J Exp Med* 185 [9], pp. 1651-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9151902
- Hemmer, B.; Pinilla, C.; Gran, B.; Vergelli, M.; Ling, N.; Conlon, P.; McFarland, H. F.; Houghten, R. and Martin, R. (2000): Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency, *J Immunol* 164 [2], pp. 861-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10623833
- Herr, I.; Wilhelm, D.; Bohler, T.; Angel, P. and Debatin, K. M. (1997): Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis, *Embo J* 16 [20], pp. 6200-8. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9321399
- Hin, S.; Zabel, C.; Bianco, A.; Jung, G. and Walden, P. (1999): Cutting edge: N-hydroxy peptides: a new class of TCR antagonists, *J Immunol* 163 [5], pp. 2363-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10452967
- Hindkjaer, J.; Brandt, C. A. and Kaltoft, K. (1993): Aneuploid malignant T cells from a patient with Sezary syndrome can be visualized by in situ hybridization, *Arch Dermatol* 129 [9], pp. 1141-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8363397
- Hintzen, R. Q.; de Jong, R.; Lens, S. M. and van Lier, R. A. (1994): CD27: marker and mediator of T-cell activation?, *Immunol Today* 15 [7], pp. 307-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8086099
- Horwitz, D. A.; Zheng, S. G. and Gray, J. D. (2003): The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets, *J Leukoc Biol* 74 [4], pp. 471-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14519757
- Howie, D.; Spencer, J.; DeLord, D.; Pitzalis, C.; Wathen, N. C.; Dogan, A.; Akbar, A. and MacDonald, T. T. (1998): Extrathymic T cell differentiation in the human intestine early in life, *J Immunol* 161 [11], pp. 5862-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9834065
- Hu, H. M.; Dols, A.; Meijer, S. L.; Floyd, K.; Walker, E.; Urba, W. J. and Fox, B. A. (2004): Immunological monitoring of patients with melanoma after peptide vaccination using soluble peptide/HLA-A2 dimer complexes, *J Immunother* 27 [1], pp. 48-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676633
- Hunt, D. F.; Michel, H.; Dickinson, T. A.; Shabanowitz, J.; Cox, A. L.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Grey, H. M. and Sette, A. (1992): Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad, *Science* 256 [5065], pp. 1817-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1319610
- Jensenius, J. C. and Williams, A. F. (1982): The T lymphocyte antigen receptor--paradigm lost, *Nature* 300 [5893], pp. 583-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6755269
- Jochmus, I.; Osen, W.; Altmann, A.; Buck, G.; Hofmann, B.; Schneider, A.; Gissmann, L. and Rammensee, H. G. (1997): Specificity of human cytotoxic T lymphocytes induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptide, *J Gen Virol* 78 (Pt 7), pp. 1689-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9225046
- Jones, D.; Dang, N. H.; Duvic, M.; Washington, L. T. and Huh, Y. O. (2001): Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood, *Am J Clin Pathol* 115 [6], pp. 885-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11392886

- Ju, S. T.; Panka, D. J.; Cui, H.; Ettinger, R.; el-Khatib, M.; Sherr, D. H.; Stanger, B. Z. and Marshak-Rothstein, A. (1995): Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation, *Nature* 373 [6513], pp. 444-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7530337
- Kalergis, A. M.; Boucheron, N.; Doucey, M. A.; Palmieri, E.; Goyarts, E. C.; Vegh, Z.; Luescher, I. F. and Nathenson, S. G. (2001): Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex, *Nat Immunol* 2 [3], pp. 229-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11224522
- Kaltoft, K.; Bisballe, S.; Dyrberg, T.; Boel, E.; Rasmussen, P. B. and Thestrup-Pedersen, K. (1992): Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides, *In Vitro Cell Dev Biol* 28A [3 Pt 1], pp. 161-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1582990
- Kaltoft, K.; Bisballe, S.; Rasmussen, H. F.; Thestrup-Pedersen, K.; Thomsen, K. and Sterry, W. (1987): A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome, *Arch Dermatol Res* 279 [5], pp. 293-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3498444
- Karenko, L.; Hyytinen, E.; Sarna, S. and Ranki, A. (1997): Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods, *J Invest Dermatol* 108 [1], pp. 22-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8980281
- Kelly, A. P.; Monaco, J. J.; Cho, S. G. and Trowsdale, J. (1991): A new human HLA class II-related locus, DM, *Nature* 353 [6344], pp. 571-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1922365
- Kersh, G. J.; Miley, M. J.; Nelson, C. A.; Grakoui, A.; Horvath, S.; Donermeyer, D. L.; Kappler, J.; Allen, P. M. and Fremont, D. H. (2001): Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue, *J Immunol* 166 [5], pp. 3345-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11207290
- Kokame, K.; Kato, H. and Miyata, T. (1998): Nonradioactive differential display cloning of genes induced by homocysteine in vascular endothelial cells, *Methods* 16 [4], pp. 434-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049651
- Kuon, W.; Holzthutter, H. G.; Appel, H.; Grolms, M.; Kollnberger, S.; Traeder, A.; Henklein, P.; Weiss, E.; Thiel, A.; Lauster, R.; Bowness, P.; Radbruch, A.; Kloetzel, P. M. and Sieper, J. (2001): Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases, *J Immunol* 167 [8], pp. 4738-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11591805
- Kurdistani, S. K.; Arizti, P.; Reimer, C. L.; Sugrue, M. M.; Aaronson, S. A. and Lee, S. W. (1998): Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and

- DNA damage, *Cancer Res* 58 [19], pp. 4439-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9766676
- La Rosa, C.; Krishnan, R.; Markel, S.; Schneck, J. P.; Houghten, R.; Pinilla, C. and Diamond, D. J. (2001): Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries, *Blood* 97 [6], pp. 1776-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238120
- Lachat, P.; Shaw, P.; Gebhard, S.; van Belzen, N.; Chaubert, P. and Bosman, F. T. (2002): Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues, *Histochem Cell Biol* 118 [5], pp. 399-408. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432451
- Laetsch, B.; Haffner, A. C.; Dobbeling, U.; Seifert, B.; Ludwig, E.; Burg, G. and Dummer, R. (2000): CD4 + /CD7- T cell frequency and polymerase chain reaction-based clonality assay correlate with stage in cutaneous T cell lymphomas, *J Invest Dermatol* 114 [1], pp. 107-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10620124
- Lanzavecchia, A. (1998): Immunology. Licence to kill, *Nature* 393 [6684], pp. 413-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9623994
- Le Bouteiller, P. and Lenfant, F. (1996): Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story, *Res Immunol* 147 [5], pp. 301-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8876058
- Lee, P. P.; Yee, C.; Savage, P. A.; Fong, L.; Brockstedt, D.; Weber, J. S.; Johnson, D.; Swetter, S.; Thompson, J.; Greenberg, P. D.; Roederer, M. and Davis, M. M. (1999): Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients, *Nat Med* 5 [6], pp. 677-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10371507
- Lin, T. M. and Chang, C. (1997): Cloning and characterization of TDD5, an androgen target gene that is differentially repressed by testosterone and dihydrotestosterone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [10], pp. 4988-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9144177
- Linnemann, T.; Brock, C.; Sparbier, K.; Muche, M.; Mielke, A.; Lukowsky, A.; Sterry, W.; Kaltoft, K.; Wiesmuller, K. H. and Walden, P. (1998): Identification of epitopes for CTCL-specific cytotoxic T lymphocytes, *Adv Exp Med Biol* 451, pp. 231-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10026877
- Linnemann, T.; Tumenjargal, S.; Gellrich, S.; Wiesmuller, K.; Kaltoft, K.; Sterry, W. and Walden, P. (2001): Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries, *Eur J Immunol* 31 [1], pp. 156-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11169449

- Liu, C.; Zhang, L.; Shao, Z. M.; Beatty, P.; Sartippour, M.; Lane, T. F.; Barsky, S. H.; Livingston, E. and Nguyen, M. (2002): Identification of a novel endothelial-derived gene EG-1, Biochem Biophys Res Commun 290 [1], pp. 602-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11779215
- Liu, H.; Hu, B.; Xu, D. and Liew, F. Y. (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4, J Immunol 171 [10], pp. 5012-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14607897
- Liyanage, U. K.; Moore, T. T.; Joo, H. G.; Tanaka, Y.; Herrmann, V.; Doherty, G.; Drebin, J. A.; Strasberg, S. M.; Eberlein, T. J.; Goedegebuure, P. S. and Linehan, D. C. (2002): Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma, J Immunol 169 [5], pp. 2756-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193750
- Long, E. O.; LaVaute, T.; Pinet, V. and Jaraquemada, D. (1994): Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide, J Immunol 153 [4], pp. 1487-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8046228
- Longthorne, V. L. and Williams, G. T. (1997): Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis, Embo J 16 [13], pp. 3805-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9233790
- Lucas, M.; Day, C. L.; Wyer, J. R.; Cunliffe, S. L.; Loughry, A.; McMichael, A. J. and Klenerman, P. (2004): Ex vivo phenotype and frequency of influenza virus-specific CD4 memory T cells, J Virol 78 [13], pp. 7284-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15194806
- MacLennan, I. C.; Gotch, F. M. and Golstein, P. (1980): Limited specific T-cell mediated cytolysis in the absence of extracellular Ca²⁺, Immunology 39 [1], pp. 109-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6769782
- Malarkannan, S.; Afkarian, M. and Shastri, N. (1995): A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells, J Exp Med 182 [6], pp. 1739-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7500018
- Maldonado, A.; Mueller, Y. M.; Thomas, P.; Bojczuk, P.; O'Connors, C. and Katsikis, P. D. (2003): Decreased effector memory CD45RA+ CD62L- CD8+ T cells and increased central memory CD45RA- CD62L+ CD8+ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients, Arthritis Res Ther 5 [2], pp. R91-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12718752
- Mason, D. (1998): A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor, Immunol Today 19 [9], pp. 395-404. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9745202

- Masson, D. and Tschopp, J. (1987): A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes, *Cell* 49 [5], pp. 679-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3555842
- McHugh, R. S.; Whitters, M. J.; Piccirillo, C. A.; Young, D. A.; Shevach, E. M.; Collins, M. and Byrne, M. C. (2002): CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor, *Immunity* 16 [2], pp. 311-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11869690
- Mielke, V.; Staib, G.; Boehncke, W. H.; Duller, B. and Sterry, W. (1994): Clonal disease in early cutaneous T-cell lymphoma, *Dermatol Clin* 12 [2], pp. 351-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8045047
- Muche, J. M.; Lukowsky, A.; Asadullah, K.; Gellrich, S. and Sterry, W. (1997): Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma, *Blood* 90 [4], pp. 1636-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9269783
- Nabholz, M. and Tschopp, J. (1989): CTL-mediated cytotoxicity: perforin and alternative pathways?, *Immunol Lett* 20 [3], pp. 179-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2785499
- Nakagawa, T.; Roth, W.; Wong, P.; Nelson, A.; Farr, A.; Deussing, J.; Villadangos, J. A.; Ploegh, H.; Peters, C. and Rudensky, A. Y. (1998): Cathepsin L: critical role in $\text{I}\alpha$ degradation and CD4 T cell selection in the thymus, *Science* 280 [5362], pp. 450-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9545226
- Nakamura, K.; Kitani, A. and Strober, W. (2001): Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β , *J Exp Med* 194 [5], pp. 629-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11535631
- Nasu, K.; Said, J.; Vonderheid, E.; Olerud, J.; Sako, D. and Kadin, M. (1985): Immunopathology of cutaneous T-cell lymphomas, *Am J Pathol* 119 [3], pp. 436-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3893149
- Nguyen, M.; Corless, C. L.; Kraling, B. M.; Tran, C.; Atha, T.; Bischoff, J. and Barsky, S. H. (1997): Vascular expression of E-selectin is increased in estrogen-receptor-negative breast cancer: a role for tumor-cell-secreted interleukin-1 α , *Am J Pathol* 150 [4], pp. 1307-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9094987
- Ni, X.; Hazarika, P.; Zhang, C.; Talpur, R. and Duvic, M. (2001): Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape?, *Clin Cancer Res* 7 [9], pp. 2682-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11555580

- Nielsen, M. B.; Kirkin, A. F.; Loftus, D.; Nissen, M. H.; Rivoltini, L.; Zeuthen, J.; Geisler, C. and Odum, N. (2000): Amino acid substitutions in the melanoma antigen recognized by T cell 1 peptide modulate cytokine responses in melanoma-specific T cells, *J Immunother* 23 [4], pp. 405-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10916749
- Nikolova, M.; Bagot, M.; Boumsell, L. and Bensussan, A. (2002): Identification of cell surface molecules characterizing human cutaneous T-cell lymphomas, *Leuk Lymphoma* 43 [4], pp. 741-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12153159
- Nocentini, G.; Giunchi, L.; Ronchetti, S.; Krausz, L. T.; Bartoli, A.; Moraca, R.; Migliorati, G. and Riccardi, C. (1997): A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [12], pp. 6216-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9177197
- Novellino, L.; Renkvist, N.; Rini, F.; Mazzocchi, A.; Rivoltini, L.; Greco, A.; Deho, P.; Squarcina, P.; Robbins, P. F.; Parmiani, G. and Castelli, C. (2003): Identification of a mutated receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa as a novel, class II HLA-restricted melanoma antigen, *J Immunol* 170 [12], pp. 6363-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12794170
- Oxenius, A.; Bachmann, M. F.; Ashton-Rickardt, P. G.; Tonegawa, S.; Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1995): Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system, *Eur J Immunol* 25 [12], pp. 3402-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8566030
- Parham, P. (2000): NK cell receptors: of missing sugar and missing self, *Curr Biol* 10 [5], pp. R195-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10712900
- Pasternack, M. S.; Verret, C. R.; Liu, M. A. and Eisen, H. N. (1986): Serine esterase in cytolytic T lymphocytes, *Nature* 322 [6081], pp. 740-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3489187
- Pfreundschuh, M.; Shiku, H.; Takahashi, T.; Ueda, R.; Ransohoff, J.; Oettgen, H. F. and Old, L. J. (1978): Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 [10], pp. 5122-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=283420
- Pinet, V. M. and Long, E. O. (1998): Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes, *Eur J Immunol* 28 [3], pp. 799-804. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9541573
- Pinet, V.; Malnati, M. S. and Long, E. O. (1994): Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen, *J Immunol* 152 [10], pp. 4852-60. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8176208
- Pinilla, C.; Rubio-Godoy, V.; Dutoit, V.; Guillaume, P.; Simon, R.; Zhao, Y.; Houghten, R. A.; Cerottini, J. C.; Romero, P. and Valmori, D. (2001): Combinatorial peptide libraries as an alternative approach to the identification of ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes, *Cancer Res* 61 [13], pp. 5153-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11431354
- Podack ER, Konigsberg PJ. (1984): Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization., *J Exp Med*. 1984 Sep 1;160(3):695-710.
- Polverini, P. J. (1996): Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis, *Am J Pathol* 148 [4], pp. 1023-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8644843
- Powell, D. J., Jr. and Rosenberg, S. A. (2004): Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination, *J Immunother* 27 [1], pp. 36-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676632
- Rammensee, H. G.; Friede, T. and Stevanović, S. (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics* 41 [4], pp. 178-228. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7890324
- Rappl, G.; Muche, J. M.; Abken, H.; Sterry, W.; Tilgen, W.; Ugurel, S. and Reinhold, U. (2001): CD4(+)CD7(-) T cells compose the dominant T-cell clone in the peripheral blood of patients with Sezary syndrome, *J Am Acad Dermatol* 44 [3], pp. 456-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11209115
- Rees, W.; Bender, J.; Teague, T. K.; Kedl, R. M.; Crawford, F.; Marrack, P. and Kappler, J. (1999): An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [17], pp. 9781-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10449771
- Rezvani, K.; Grube, M.; Brenchley, J. M.; Sconocchia, G.; Fujiwara, H.; Price, D. A.; Gostick, E.; Yamada, K.; Melenhorst, J.; Childs, R.; Hensel, N.; Douek, D. C. and Barrett, A. J. (2003): Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation, *Blood* 102 [8], pp. 2892-900. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12829610
- Rich, S.; Seelig, M.; Lee, H. M. and Lin, J. (1995): Transforming growth factor beta 1 costimulated growth and regulatory function of staphylococcal enterotoxin B-responsive CD8+ T cells, *J Immunol* 155 [2], pp. 609-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7608539
- Rivoltini, L.; Squarcina, P.; Loftus, D. J.; Castelli, C.; Tarsini, P.; Mazzocchi, A.; Rini, F.; Viggiano, V.; Belli, F. and Parmiani, G. (1999): A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional

- characteristics: implication for more effective immunotherapy, *Cancer Res* 59 [2], pp. 301-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927036
- Robbins, P. F.; El-Gamil, M.; Li, Y. F.; Fitzgerald, E. B.; Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. (1997): The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes, *J Immunol* 159 [1], pp. 303-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9200467
- Roberts, A. B. (2002): The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling, *Cytokine Growth Factor Rev* 13 [1], pp. 3-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11750874
- Rocha, B.; Vassalli, P. and Guy-Grand, D. (1994): Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice, *J Exp Med* 180 [2], pp. 681-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8046341
- Roncarolo, M. G. and Levings, M. K. (2000): The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity, *Curr Opin Immunol* 12 [6], pp. 676-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11102772
- Ronsin, C.; Chung-Scott, V.; Poullion, I.; Aknouche, N.; Gaudin, C. and Triebel, F. (1999): A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ, *J Immunol* 163 [1], pp. 483-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10384152
- Rouvier, E.; Luciani, M. F. and Golstein, P. (1993): Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity, *J Exp Med* 177 [1], pp. 195-200. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7678113
- Rubio-Godoy, V.; Ayyoub, M.; Dutoit, V.; Servis, C.; Schink, A.; Rimoldi, D.; Romero, P.; Cerottini, J. C.; Simon, R.; Zhao, Y.; Houghten, R. A.; Pinilla, C. and Valmori, D. (2002a): Combinatorial peptide library-based identification of peptide ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes of unknown specificity, *Eur J Immunol* 32 [8], pp. 2292-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12209642
- Rubio-Godoy, V.; Dutoit, V.; Rimoldi, D.; Lienard, D.; Lejeune, F.; Speiser, D.; Guillaume, P.; Cerottini, J. C.; Romero, P. and Valmori, D. (2001): Discrepancy between ELISPOT IFN-gamma secretion and binding of A2/peptide multimers to TCR reveals interclonal dissociation of CTL effector function from TCR-peptide/MHC complexes half-life, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [18], pp. 10302-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11517329
- Rubio-Godoy, V.; Dutoit, V.; Zhao, Y.; Simon, R.; Guillaume, P.; Houghten, R.; Romero, P.; Cerottini, J. C.; Pinilla, C. and Valmori, D. (2002b): Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL, *J Immunol* 169 [10], pp. 5696-707. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12421949
- Rudensky, A.Yu.; Preston-Hurlburt, P.; Hong, S. C.; Barlow, A. and Janeway, C. A., Jr. (1991): Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules, *Nature* 353 [6345], pp. 622-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1656276
- Sahin, U.; Tureci, O.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schobert, I. and Pfreundschuh, M. (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [25], pp. 11810-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524854
- Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Itoh, M.; Kuniyasu, Y.; Nomura, T.; Toda, M. and Takahashi, T. (2001): Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance, *Immunol Rev* 182, pp. 18-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722621
- Salazar, E.; Zaremba, S.; Arlen, P. M.; Tsang, K. Y. and Schlom, J. (2000): Agonist peptide from a cytotoxic t-lymphocyte epitope of human carcinoembryonic antigen stimulates production of tc1-type cytokines and increases tyrosine phosphorylation more efficiently than cognate peptide, *Int J Cancer* 85 [6], pp. 829-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10709104
- Sallusto, F.; Lenig, D.; Forster, R.; Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* 401 [6754], pp. 708-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10537110
- Sato, N.; Kokame, K.; Shimokado, K.; Kato, H. and Miyata, T. (1998): Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others, *J Biochem (Tokyo)* 123 [6], pp. 1119-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9604001
- Savage, P. A.; Boniface, J. J. and Davis, M. M. (1999): A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response, *Immunity* 10 [4], pp. 485-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229191
- Schwartz, R. H. (1985): T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex, *Annu Rev Immunol* 3, pp. 237-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2415139
- Seifert, U.; Maranon, C.; Shmueli, A.; Desoutter, J. F.; Wesoloski, L.; Janek, K.; Henklein, P.; Diescher, S.; Andrieu, M.; de la Salle, H.; Weinschenk, T.; Schild, H.; Laderach, D.; Galy, A.; Haas, G.; Kloetzel, P. M.; Reiss, Y. and Hosmalin, A. (2003): An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope, *Nat Immunol* 4 [4], pp. 375-9. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12598896
- Sell, S.; Becker, F. F.; Leffert, H. L. and Watabe, L. (1976): Expression of an oncodevelopmental gene product (alpha-fetoprotein) during fetal development and adult oncogenesis, *Cancer Res* 36 [11 Pt. 2], pp. 4239-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=61804
- Seo, N.; Tokura, Y.; Matsumoto, K.; Furukawa, F. and Takigawa, M. (1998): Tumour-specific cytotoxic T lymphocyte activity in Th2-type Sezary syndrome: its enhancement by interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-12 and fluctuations in association with disease activity, *Clin Exp Immunol* 112 [3], pp. 403-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9649208
- Shevach, E. M.; McHugh, R. S.; Thornton, A. M.; Piccirillo, C.; Natarajan, K. and Margulies, D. H. (2001): Control of autoimmunity by regulatory T cells, *Adv Exp Med Biol* 490, pp. 21-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11505971
- Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. and Sakaguchi, S. (2002): Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, *Nat Immunol* 3 [2], pp. 135-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11812990
- Shimono, A.; Okuda, T. and Kondoh, H. (1999): N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant, *Mech Dev* 83 [1-2], pp. 39-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10381566
- Slifka, M. K. and Whitton, J. L. (2001): Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR, *Nat Immunol* 2 [8], pp. 711-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11477407
- Sloan, V. S.; Cameron, P.; Porter, G.; Gammon, M.; Amaya, M.; Mellins, E. and Zaller, D. M. (1995): Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR, *Nature* 375 [6534], pp. 802-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7596415
- Speir, J. A.; Garcia, K. C.; Brunmark, A.; Degano, M.; Peterson, P. A.; Teyton, L. and Wilson, I. A. (1998): Structural basis of 2C TCR allorecognition of H-2Ld peptide complexes, *Immunity* 8 [5], pp. 553-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9620676
- Steiner, M. S.; Zhou, Z. Z.; Tonb, D. C. and Barrack, E. R. (1994): Expression of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer, *Endocrinology* 135 [5], pp. 2240-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7956947
- Stern, L. J.; Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Urban, R. G.; Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1994): Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide, *Nature* 368 [6468], pp. 215-21. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8145819
- Sterry, W. and Mielke, V. (1989): CD4+ cutaneous T-cell lymphomas show the phenotype of helper/inducer T cells (CD45RA-, CDw29+), J Invest Dermatol 93 [3], pp. 413-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2527911
- Tepper, A. D.; Cock, J. G.; de Vries, E.; Borst, J. and van Blitterswijk, W. J. (1997): CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/CPP32 inhibition, J Biol Chem 272 [39], pp. 24308-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305886
- Thangavelu, M.; Finn, W. G.; Yelavarthi, K. K.; Roenigk, H. H., Jr.; Samuelson, E.; Peterson, L.; Kuzel, T. M. and Rosen, S. T. (1997): Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome, Blood 89 [9], pp. 3371-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9129044
- Tourdot, S.; Scardino, A.; Saloustrou, E.; Gross, D. A.; Pascolo, S.; Cordopatis, P.; Lemonnier, F. A. and Kosmatopoulos, K. (2000): A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes, Eur J Immunol 30 [12], pp. 3411-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11093159
- Townsend, A.; Bastin, J.; Gould, K.; Brownlee, G.; Andrew, M.; Coupar, B.; Boyle, D.; Chan, S. and Smith, G. (1988): Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen, J Exp Med 168 [4], pp. 1211-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2459295
- Trefzer, U.; Herberth, G.; Wohlan, K.; Milling, A.; Thiemann, M.; Sherev, T.; Sparbier, K.; Sterry, W. and Walden, P. (2004): Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients, Int J Cancer 110 [5], pp. 730-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15146563
- Tsamandas, A. C.; Kardamakis, D.; Ravazoula, P.; Zolota, V.; Salakou, S.; Tepetes, K.; Kalogeropoulou, C.; Tsota, I.; Kourelis, T.; Makatsoris, T.; Karavias, D.; Scopa, C. D.; Bonikos, D. S.; Kalofonos, H. P. and Petsas, T. (2004): The potential role of TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3 protein expression in colorectal carcinomas. Correlation with classic histopathologic factors and patient survival, Strahlenther Onkol 180 [4], pp. 201-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15057430
- Tschopp, J. and Jongeneel, C. V. (1988): Cytotoxic T lymphocyte mediated cytolysis, Biochemistry 27 [8], pp. 2641-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3042021
- Tumenjargal, S.; Gellrich, S.; Linnemann, T.; Muche, J. M.; Lukowsky, A.; Audring, H.; Wiesmuller, K. H.; Sterry, W. and Walden, P. (2003): Anti-tumor immune responses and tumor regression induced with mimotopes of a tumor-associated T cell epitope,

- Eur J Immunol 33 [11], pp. 3175-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14579286
- Udaka, K.; Wiesmuller, K. H.; Kienle, S.; Jung, G. and Walden, P. (1995): Decrypting the structure of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes with complex peptide libraries, J Exp Med 181 [6], pp. 2097-108. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7539039
- Udaka, K.; Wiesmuller, K. H.; Kienle, S.; Jung, G. and Walden, P. (1996): Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone, J Immunol 157 [2], pp. 670-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8752916
- Valitutti, S. and Lanzavecchia, A. (1997): Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition, Immunol Today 18 [6], pp. 299-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9190117
- Valmori, D.; Dutoit, V.; Schnuriger, V.; Quiquerez, A. L.; Pittet, M. J.; Guillaume, P.; Rubio-Godoy, V.; Walker, P. R.; Rimoldi, D.; Lienard, D.; Cerottini, J. C.; Romero, P. and Dietrich, P. Y. (2002): Vaccination with a Melan-A peptide selects an oligoclonal T cell population with increased functional avidity and tumor reactivity, J Immunol 168 [8], pp. 4231-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11937585
- Valmori, D.; Fonteneau, J. F.; Lizana, C. M.; Gervois, N.; Lienard, D.; Rimoldi, D.; Jongeneel, V.; Jotereau, F.; Cerottini, J. C. and Romero, P. (1998a): Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues, J Immunol 160 [4], pp. 1750-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9469433
- Valmori, D.; Gervois, N.; Rimoldi, D.; Fonteneau, J. F.; Bonelo, A.; Lienard, D.; Rivoltini, L.; Jotereau, F.; Cerottini, J. C. and Romero, P. (1998b): Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide, J Immunol 161 [12], pp. 6956-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9862730
- van Belzen, N.; Dinjens, W. N.; Diesveld, M. P.; Groen, N. A.; van der Made, A. C.; Nozawa, Y.; Vlietstra, R.; Trapman, J. and Bosman, F. T. (1997): A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms, Lab Invest 77 [1], pp. 85-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9251681
- van der Bruggen, P.; Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; De Plaen, E.; Van den Eynde, B.; Knuth, A. and Boon, T. (1991): A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, Science 254 [5038], pp. 1643-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1840703

- Varshavsky, A. (1997): The ubiquitin system, *Trends Biochem Sci* 22 [10], pp. 383-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9357313
- Vassilakos, A.; Cohen-Doyle, M. F.; Peterson, P. A.; Jackson, M. R. and Williams, D. B. (1996): The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules, *Embo J* 15 [7], pp. 1495-506. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8612572
- Verheij, M.; Bose, R.; Lin, X. H.; Yao, B.; Jarvis, W. D.; Grant, S.; Birrer, M. J.; Szabo, E.; Zon, L. I.; Kyriakis, J. M.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z. and Kolesnick, R. N. (1996): Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, *Nature* 380 [6569], pp. 75-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8598911
- Walunas, T. L.; Lenschow, D. J.; Bakker, C. Y.; Linsley, P. S.; Freeman, G. J.; Green, J. M.; Thompson, C. B. and Bluestone, J. A. (1994): CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation, *Immunity* 1 [5], pp. 405-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7882171
- Wang, H. Y.; Lee, D. A.; Peng, G.; Guo, Z.; Li, Y.; Kiniwa, Y.; Shevach, E. M. and Wang, R. F. (2004): Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy, *Immunity* 20 [1], pp. 107-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14738769
- Wang-Johanning, F.; Frost, A. R.; Jian, B.; Epp, L.; Lu, D. W. and Johanning, G. L. (2003): Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer, *Oncogene* 22 [10], pp. 1528-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12629516
- Whiteside, T. L. and Rabinowich, H. (1998): The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors, *Cancer Immunol Immunother* 46 [4], pp. 175-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9671140
- Willemze, R.; Kerl, H.; Sterry, W.; Berti, E.; Cerroni, L.; Chimenti, S.; Diaz-Perez, J. L.; Geerts, M. L.; Goos, M.; Knobler, R.; Ralfkiaer, E.; Santucci, M.; Smith, N.; Wechsler, J.; van Vloten, W. A. and Meijer, C. J. (1997): EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, *Blood* 90 [1], pp. 354-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207472
- Winter, D.; Fiebiger, E.; Meraner, P.; Auer, H.; Brna, C.; Strohal, R.; Trautinger, F.; Knobler, R.; Fischer, G. F.; Stingl, G. and Maurer, D. (2003): Definition of TCR epitopes for CTL-mediated attack of cutaneous T cell lymphoma, *J Immunol* 171 [5], pp. 2714-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12928425
- Wolf, P. R. and Ploegh, H. L. (1995): How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway, *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, pp. 267-306. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8689559
- Woll, M. M.; Fisher, C. M.; Ryan, G. B.; Gurney, J. M.; Storrer, C. E.; Ioannides, C. G.; Shriver, C. D.; Moul, J. W.; McLeod, D. G.; Ponniah, S. and Peoples, G. E. (2004): Direct measurement of peptide-specific CD8⁺ T cells using HLA-A2:Ig dimer for monitoring the in vivo immune response to a HER2/neu vaccine in breast and prostate cancer patients, *J Clin Immunol* 24 [4], pp. 449-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15163902
- Woo, E. Y.; Yeh, H.; Chu, C. S.; Schlienger, K.; Carroll, R. G.; Riley, J. L.; Kaiser, L. R. and June, C. H. (2002): Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation, *J Immunol* 168 [9], pp. 4272-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11970966
- Yee, C.; Savage, P. A.; Lee, P. P.; Davis, M. M. and Greenberg, P. D. (1999): Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers, *J Immunol* 162 [4], pp. 2227-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973498
- Yu, J.; Zhang, L.; Hwang, P. M.; Rago, C.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1999): Identification and classification of p53-regulated genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [25], pp. 14517-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10588737
- Zheng, S. G.; Wang, J. H.; Koss, M. N.; Quismorio, F., Jr.; Gray, J. D. and Horwitz, D. A. (2004): CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome, *J Immunol* 172 [3], pp. 1531-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14734731
- Zhou, D.; Salnikow, K. and Costa, M. (1998): Cap43, a novel gene specifically induced by Ni²⁺ compounds, *Cancer Res* 58 [10], pp. 2182-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9605764
- Zoi-Toli, O.; Vermeer, M. H.; De Vries, E.; Van Beek, P.; Meijer, C. J. and Willemze, R. (2000): Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL, *Br J Dermatol* 143 [2], pp. 313-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10951138

9 Anhang

Proteinquellen für potentielle PN2-Epitope

| Nr. | Sequenz | Acc.Nr | Name |
|-----|------------|---------------|---|
| 6 | KADWWTNtA | AAC61776 | splicing factor Prp8 spliceosomes |
| 12 | KICAWMQLA | XP_167086 | Similar to putative Hypothetical protein |
| 13 | KINNWLNHA | M64082 | Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide forming] 1 |
| 16 | KLAGWHRIA | AAH14425 | similar to EGFR |
| 21 | KLLGWTHCA | P29144 | Similar to tripeptidyl aminopeptidase |
| 22 | KLQFWAVTA | NM_000157 | GLCM_HUMAN Glucosylceramidase precursor |
| 25 | KVIFWSALA | AL136897 | Hypothetical protein FLJ11301 |
| 32 | RAKYWLERA | NM_006267 | Ran-binding protein 2 (RanBP2) |
| 33 | RAKYWVERA | AL136868 | Hypothetical protein |
| 34 | RALWWAVGA | BC040487 | Hypothetical protein FLJ35773 |
| 39 | RILHWQRAA | AB037735 | Hypothetical protein FLJ10312 |
| 40 | RINYWHLEA | U57317 | Histone acetylase P300/CBP-associated factor |
| 45 | RLIYWLTF A | NM_032323 | Similar to RIKEN cDNA 2310042N02 gene |
| 46 | RLLGWSLPA | NM_007103 | (IP-30) precursor |
| 47 | RLTFWTCLA | BC030577 | orphan protein-coupled receptor 85, |
| 49 | RLVHWCHGA | AB035966 | Hypothetical protein (Fragment) |
| 50 | RLVYWLEVA | BC040878 | Hypothetical protein (Fragment) |
| 53 | RVKGWAPRA | <i>Q9H0W5</i> | Hypothetical protein |
| 54 | RVLGWVAEA | AY046396 | Transient receptor potential cation channel |
| 56 | RVNAWQAKA | M16967 | Coagulation factor V |
| 57 | RVRAWQRG A | AF242530 | Protein kinase C and casein kinase substance |
| 124 | KALQWVSAI | <i>P01767</i> | Ig heavy chain V-III region BUT |
| 126 | KAPHWTNRI | NM_004912 | Krev interaction trapped 1 (Krit1) |
| 129 | KISNWTAAI | <i>P49019</i> | Probable G protein-coupled receptor HM74 |
| 130 | KITWWLCAI | AF506797 | Sodium/potassium-transporting ATPase |
| 145 | RANHWSAII | AB051390 | KIAA0762 protein |
| 152 | RLQHWLWSI | AL833964 | Hypothetical protein |
| 153 | RVDFWTSTI | NM_145024 | Hypothetical protein FLJ31547 |
| 254 | KILGWAWWL | AK096402 | Hypothetical protein FLJ39083 |
| 255 | KINNWI VQL | NM_003367 | Upstream transcription factor 1 |
| 258 | KISGWTQAL | NM_006096 | Hypothetical protein FLJ38330 |
| 267 | KLKFWTVDL | AJ242956 | HPV(human papilloma virus) |
| 261 | KLDYWSFQL | P18384 | Vaccinia virus, Serin protease inhibitor |
| 269 | KLLHWVSL L | NM_153447 | Mater protein homolog |
| 271 | KLNCWGSRL | BC031300 | Protein C21orf2 (C21orf-HUMF09G8.5) |
| 274 | KLPHTPTL | NP_039870 | Hypothetical BZLF2 protein (HSV-4) |

| | | | |
|-----|-----------|-----------|---|
| 276 | KLRHWQQVL | AF358829 | Tumor-related protein |
| 277 | KLRNWHHGL | Q9Y4Z5 | ZASP protein |
| 288 | KVINWQTSL | AF104413 | Large tumor suppressor 1 |
| 329 | RITYWQRL | NM_021819 | ERGL_HUMAN ERGIC-53-like protein precursor Lectin |
| 331 | RLICWQALL | NM_002048 | Growth-arrest-specific protein 1 precursor |
| 337 | RLLYWNRKL | M99564 | P protein (Melanocyte-specific transporter) |
| 346 | RLRHWVYLL | NM_004278 | N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol |
| 349 | RLSHWGRR | AF258560 | PP367 |
| 350 | RLSNWNISL | AB018349 | Hypothetical protein KIAA0806 |
| 354 | RLVYWLHTL | AL035689 | DJ187J11.2.5 [Fragment] |
| 356 | RLYYWGLGL | AF119871 | PRO2268 |
| 357 | RVAAWVEAL | AK000043 | cDNA FLJ20036 fis, clone COL00219 |
| 358 | RVAFWIIKL | AAF02678 | Soggy-1 protein precursor (SGY-1) |
| 359 | RVCCWTPRL | BC000046 | intercellular adhesion molecule 4 |
| 361 | RVLDWVPKL | BC007523 | neuron navigator 1, KIAA1151, FLJ12560 |
| 363 | RVLFWGRIL | BC029519 | chromosome 6 open reading frame 205 |
| 364 | RVMGWVSG | NM_003660 | tyrosin phosphatase |
| 365 | RVNGWSLPL | NM_024786 | Zinc finger DHHC domain containing protein |
| 366 | RVPAWGRCL | P10193 | Herpes simplex virus (type 1 / strain 17) |
| 367 | RVSWWGSTL | NM_021819 | Putative transposase (TRAMP) |
| 370 | RVVPWNVTL | AF027204 | Transmembrane 4 superfamily, member 5 |
| 458 | KAAYWASQV | AAD51799 | Endogenous retrovirus HERV-K10, Gag-Pro-Pol protein |
| 459 | KAKYWSSNV | AF392446 | Oxysterol-binding protein-like protein OSBPL |
| 466 | KIIPWNSRV | U38847 | TAR RNA loop binding protein (HIV) |
| 469 | KIPGWQAEV | NM_003597 | Transforming growth factor-beta-inducible protein |
| 476 | KLAFWLLAV | AB075832 | KIAA1952 Protein |
| 478 | KLKFWTHCV | BC042615 | Similar to v-maf fibrosarcoma (homo sapiens) |
| 481 | KLLFWVTEV | NM_024057 | Nucleoporin Nup37 (p37) |
| 482 | KLLYWNMAV | AF340183 | Fanconi anemia complementation group D2 |
| 484 | KLPPWNPQV | AH011243 | T-cell differentiation antigen CD6 precursor |
| 490 | KVAFWLELV | AY358562 | Hypothetical protein DKFZp686B22115 |
| 502 | RADFWMPAV | Y10523 | Hypothetical protein KIAA0364 |
| 503 | RAPFWGLRV | CAA27272 | Human parainfluenza virus 1 |
| 504 | RAQFWSAYV | BC024021 | Dipeptidase 2 |
| 507 | RASFWLALV | NM_001957 | Endothelin receptor type A |
| 508 | RAVFWIEFV | S11309 | UDP glycosyltransferase 2 family (EC 2.4.1.17) |
| 509 | RIDWWGFRV | NM_007272 | BA265F14.1 (chymotrypsin C (caldecrin)) |
| 510 | RIPPWMEVV | NM_019014 | POLR1B protein (RNA polymerase I polypeptideB) |
| 511 | RIQFWIAAV | NM_032824 | Hypothetical protein FLJ14681 |
| 512 | RISAWQSPV | AJ309567 | Bile acid beta-glucosidase |
| 519 | RLNWWSTV | AJ430383 | chromosome 15 open reading frame 16 |

| | | | |
|-----|-----------|-----------|---|
| 520 | RLNWWVSVD | NM_020205 | similar to zinc finger protein Cezanne |
| 521 | RLQNWVYNV | NM_004700 | potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily |
| 522 | RLRAWGARV | BC014895 | Similar to hypothetical protein MGC10204 |
| 523 | RLRWWQPFV | NP_774959 | reelin isoform b |
| 526 | RVCYWTIRV | AB059618 | Kremen protein 1 precursor |
| 527 | RVIFWSLYV | AB032958 | KIAA1132 protein |
| 528 | RVLAWMFLV | P14351 | ENV polyprotein [Human spumaretrovirus (Foamy virus)] |
| 531 | RVLPWQAQV | NM_024807 | Hypothetical protein FLJ13693 |
| 532 | RVLYWIPVV | NM_016353 | zinc finger, DHHC domain containing 2, clone |
| 534 | RVSHWMLGV | Q9H114 | Cystatin-like 1 precursor |
| 535 | RVVGWSNIV | Q88434 | RNA polymerase beta subunit Simian virus 5 |

10 Publikationensliste

Linnemann, T., Tumenjargal Sherev, Gellrich, S., Wiesmuller, K., Kaltoft, K., Sterry, W. and Walden, P., Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. Eur J Immunol 2001. 31: 156-165.

Demine, R., Tumenjargal Sherev, and Walden, P., Biochemical determination of natural tumor-associated T-cell epitopes. Mol Biotechnol 2003. 25: 71-78.

Tumenjargal Sherev, Wiesmuller, K. H. and Walden, P., Mimotopes of tumor-associated T-cell epitopes for cancer vaccines determined with combinatorial peptide libraries. Mol Biotechnol 2003. 25: 53-61.

Tumenjargal Sherev, Gellrich, S., Linnemann, T., Muche, J. M., Lukowsky, A., Audring, H., Wiesmuller, K. H., Sterry, W. and Walden, P., Anti-tumor immune responses and tumor regression induced with mimotopes of a tumor-associated T cell epitope. Eur J Immunol 2003. 33: 3175-3185.

Tanja C. Fischer, Sylke Gellrich, J. Marcus Muche, Tumenjargal Sherev, Heike Audring, Heidemarie Neitzel, Peter Walden, Wolfram Sterry and Holger Tönnies, Analysis of cutaneous T cell lymphoma with comparative genomic hybridization (CGH) reveals a characteristic pattern of chromosomal aberrations: Correlation with the clinical course. J Invest Dermatol 2004. 122: 579-586.

Uwe Trefzer, Gunda Herberth, Karolina Wohlan, Annet Milling, Max Thiemann, Tumenjargal Sherev, Katrin Sparbier, Wolfram Sterry, and Peter Walden, Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. Int J Cancer 2004. 110(5): 730-740.

Konferenzbeiträge:

mündliche Präsentationen:

„XXVII. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)“, Wien, Österreich, 2000

“14th Annual Meeting of the European Federation of the Immunological Societies (EFIS)“, Poznan, Polen, 2000

“11th International Congress of Immunology“, Stockholm, Schweden, 2001

„International Symposium on the Biology and Immunology of cutaneous Lymphoma“, Berlin, 2002

Posterpräsentationen:

“91th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR)“, San Francisco, CA, USA, 2000

“30th Annual Meeting. of the European Society of the Dermatological Research (ESDR)“, Berlin, 2001

Posterpreis bei „XXVIII. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)“, München, 2001

34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 2003

